

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему

«Створення рекомбінантних генетичних конструкцій плазмід та їх експресія у
клітинах K562»

Рівень вищої освіти другий (магістерський)

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма Біотехнологія високомолекулярних сполук

Виконала: студентка групи МгБТ-24

Матвєєнко А. С.

Науковий керівник: к.б.н., доц. Юнгін О.С.

Рецензент: к.т.н., доц. Охмат О.А.

Київ 2025

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет	<u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u>
Кафедра	<u>біотехнології, шкіри та хутра</u>
Рівень вищої освіти	<u>другий (магістерський)</u>
Спеціальність	<u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>
Освітня програма	<u>Біотехнологія високомолекулярних сполук</u>

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри БШХ

_____ Олена МОКРОУСОВА
« ____ » _____ 2025 р.

**ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ
Матвєєнко Анастасії Сергіївні**

1. Тема кваліфікаційної роботи: Створення рекомбінантних генетичних конструкцій плазмід та їх експресія у клітинах K562

науковий керівник роботи Юнгін Ольга Сергіївна, к.б.н., доц.
затверджені наказом КНУТД від «16» вересня 2025 року № 209-уч.

1. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: завдання на кваліфікаційну роботу; наукова література щодо хронічної мієлоїдної лейкемії, онкопротейну Bcr-Abl та деубіквітінази USP1; протоколи створення рекомбінантних плазмід; технологічні параметри здійснення трансфекції та культивування клітин лінії K562; методики імунофлуоресцентного аналізу та конфокальної мікроскопії для оцінки колокалізації білків; матеріали науково-дослідної та переддипломної практик

2. Зміст кваліфікаційної роботи: вступ; огляд літератури; об'єкт, мета та методи дослідження; експериментальна частина, висновки, список використаних джерел, додатки.

1. Дата видачі завдання 17.09.2025 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапу кваліфікаційної роботи	Орієнтовний терміни виконання	Примітка про виконання
1	Вступ		
2	Розділ 1 Огляд літератури		
3	Розділ 2 Об'єкт, мета та методи дослідження		
4	Розділ 3 Експериментальна частина		
5	Висновки		
6	Оформлення кваліфікаційної роботи (чистовий варіант)		
7	Подача кваліфікаційної роботи науковому керівнику для відгуку (за 14 днів до захисту)		
8	Подача кваліфікаційної роботи для рецензування (за 12 днів до захисту)		
9	Перевірка кваліфікаційної роботи на наявність ознак плагіату (за 10 днів до захисту)		Коефіцієнт подібності ____% Коефіцієнт цитування ____%
10	Подання кваліфікаційної роботи на підпис завідувачу кафедри (за 7 днів до захисту)		

З завданням ознайомлений:

Студентка _____ Анастасія МАТВЄЄНКО

Науковий керівник _____ Ольга ЮНГІН

АНОТАЦІЯ

Матвєєнко А. С. Створення рекомбінантних генетичних конструкцій плазмід та їх експресія у клітинах K562. – Рукопис.

Кваліфікаційна робота за спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2025 рік.

Кваліфікаційна робота присвячена дослідженню особливостей створення рекомбінантних генетичних конструкцій плазмід та їх експресії у клітинах K562. У роботі представлено літературний огляд джерел, який присвячений ролі Bcr-Abl та деубіквітинази USP1 у регуляції стабільності білкових комплексів та потенціалу використання доменної експресії USP1 для таргетної терапії.

У межах роботи розроблено дві рекомбінантні плазмідні конструкції, проведено їх трансфекцію у клітини K562, оцінено локалізацію доменів USP1 та їх колокалізацію з Bcr-Abl за допомогою імунофлуоресцентного фарбування та конфокальної мікроскопії. Проведено аналіз отриманих даних, що дозволив визначити домен USP1 з найбільш активною взаємодією з Bcr-Abl.

Отримані результати можуть бути використані для подальших досліджень білкових взаємодій у клітинах ХМЛ та розробки нових підходів таргетної терапії.

Ключові слова: хронічна мієлоїдна лейкемія, Bcr-Abl, USP1, рекомбінантні плазмідни, домени білка, колокалізація.

ABSTRACT

Matvieienko A.S. Creation of Recombinant Plasmid Genetic Constructs and Their Expression in K562 Cells. – Manuscript.

Qualification work in the speciality 162 Biotechnology and bioengineering. - Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2025.

The master's thesis is dedicated to the study of the features of creating recombinant plasmid genetic constructs and their expression in K562 cells. The work presents a literature review focusing on the role of Bcr-Abl and the deubiquitinase USP1 in regulating the stability of protein complexes and the potential application of domain-specific USP1 expression for targeted therapy.

Within the framework of the study, two recombinant plasmid constructs were developed, transfected into K562 cells, and the localization of USP1 domains and their colocalization with Bcr-Abl were assessed using immunofluorescent staining and confocal microscopy. The obtained data were analyzed, allowing the identification of the USP1 domain exhibiting the most pronounced interaction with Bcr-Abl.

The results can be used for further studies of protein–protein interactions in CML cells and for developing novel targeted therapeutic approaches.

Keywords: chronic myeloid leukemia, Bcr-Abl, USP1, recombinant plasmids, protein domains, colocalization.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	4
ВСТУП	10
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	15
1.1 Хронічна мієлоїдна лейкемія: історія, патогенез, клінічні фази та існуючі підходи до лікування.....	15
1.1.1 Історичний розвиток наукових уявлень про хронічну мієлоїдну лейкемію	16
1.1.2 Епідеміологія	19
1.1.3 Патогенез та клінічні стадії ХМЛ.....	19
1.1.4 Діагностика ХМЛ	21
1.1.5 Методи лікування хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ)	21
1.1.5.1 Інгібітори тирозинкіназ першого покоління.....	22
1.1.5.2 Інгібітори тирозинкіназ другого покоління	22
1.1.5.3 Інгібітори тирозинкіназ третього покоління.....	23
1.1.5.4 Аутофагія та деякі інші сучасні альтернативні підходи боротьби з ХМЛ.....	23
1.2 Онкобілок Bcr-Abl як ключовий фактор у патогенезі хронічної мієлоїдної лейкемії.....	25
1.2.1 Молекулярна біологія хронічної мієлоїдної лейкемії	25
1.2.2 Структура білка Bcr-Abl	26
1.2.3 Ізоформи Bcr-Abl.....	27
1.2.4 Локалізація та функції Bcr-Abl.....	29
1.2.5 Механізми дії Bcr-Abl	30
1.2.6 Клінічне значення Bcr-Abl.....	30
1.3. Характеристика убіквітин-специфічної протеази-1 (USP1).....	31

1.3.1 Убіквітин-протеасомна система: регуляція, механізми та терапевтичний потенціал.....	31
1.3.1.1 Механізм функціонування UPS	31
1.3.1.2 Біологічна роль та значення UPS.....	32
1.3.1.3.Терапевтичні перспективи	32
1.3.2 Характеристика убіквітин-специфічної протеази USP1	33
1.3.2.1 Структура USP1	33
1.3.2.2 Функції USP1	34
1.3.2.3 Роль USP у пухлиноутворенні та прогресуванні раку	35
1.3.2.4 Локалізація USP1	35
1.3.2.5 Механізм дії USP1 на онкопротеїн Bcr-Abl	36
1.3.2.6. Перспективи використання інгібіторів USP у терапії ХМЛ	36
Висновки до розділу 1	37
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	39
2.1 Характеристика об'єкту і предмету дослідження	39
2.2 Основні та допоміжних матеріали	39
2.2.1. Реактиви	39
2.2.2 Підготовка буферних розчинів та поживних середовищ	40
2.2.3 Використані у роботі ферменти та антитіла	44
2.2.4 Біологічний матеріал.....	45
2.2.5 Обладнання.....	45
2.3 Створення рекомбінантних генетичних конструкцій pECFP-C3-USP1-domain-1 та pECFP-C3-USP1-domain-2 та їх експресія в клітинах K562	46
2.3.1 Створення рекомбінантних генетичних конструкцій pECFP-C3-USP1-domain-1 та pECFP-C3-USP1-domain-2	46

2.3.2 Трансфекція клітинної лінії K562 плазмідною ДНК рECFP-C3-USP1-domain-1 та рECFP-C3-USP1-domain-2	52
Висновки до розділу 2	57
РОЗДІЛ 3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	59
3.1 Створені рекомбінантні генетичні конструкції рECFP-C3-USP1-domain-1 та рECFP-C3-USP1-domain-2	59
3.2 Структурна будова білків USP1-domain-1 та USP1-domain-2.....	61
3.3 Результати конфокальної мікроскопії.....	63
3.4 Аналіз колокалізації доменів білка USP1 з онкопротеїном Bcr-Abl у клітинах лінії K562.....	65
3.5 Порівняльний BoxPlot-аналіз коефіцієнтів Пірсона та Мандерса для доменів USP1-domain-1 і USP1-domain-2	67
3.5.1 Порівняльний BoxPlot-аналіз коефіцієнтів Пірсона для USP1-domain-1 та USP1-domain-2	67
3.5.2.1 Порівняльний BoxPlot-аналіз коефіцієнтів Мандерса (original) для USP1-domain-1 та USP1-domain-2	69
3.5.2.2 Порівняльний BoxPlot-аналіз коефіцієнтів Мандерса з урахуванням порогового значення для USP1-domain-1 та USP1-domain-2	70
Висновки до розділу 3	72
ВИСНОВКИ.....	73
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	75
ДОДАТКИ	83
ДОДАТОК А	83
ДОДАТОК Б.....	92
ДОДАТОК В.....	94
ДОДАТОК Г.....	104

ДОДАТОК Д.....	111
ДОДАТОК Е.....	118
ДОДАТОК Ж	123

ВСТУП

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) є однією з найпоширеніших мієлоїдних лейкемій у дорослих, що характеризується поступовим збільшенням мієлоїдних клітин у крові та кістковому мозку. Основною молекулярною особливістю ХМЛ є химерний онкопротеїн Bcr-Abl, що утворюється внаслідок транслокації t(9;22) («філадельфійська хромосома») та має конститутивну тирозинкіназну активність, стимулюючи проліферацію клітин і пригнічуючи апоптоз.

Впровадження препаратів на основі інгібіторів тирозинкінази (імаїніб, нілотиніб, дазатиніб) суттєво покращило прогноз і тривалість життя хворих на ХМЛ, проте у частини пацієнтів розвивається резистентність внаслідок мутації в гені BCR-ABL та стабілізацією онкопротеїну. Це підкреслює необхідність пошуку нових молекулярних мішеней для таргетної терапії.

Перспективним напрямом є вивчення деубіквітиназ, зокрема USP1, яка регулює стабільність білкових комплексів через убіквітин-залежну деградацію та може впливати на стабільність Bcr-Abl. Функціональні особливості доменної організації USP1 та її колокалізації з Bcr-Abl залишаються недостатньо дослідженими, що обмежує розробку нових терапевтичних стратегій.

Актуальність теми обумовлена необхідністю детального аналізу механізмів білкових взаємодій у клітинах ХМЛ для створення ефективних молекулярно-цільових підходів терапії. Вивчення доменів USP1 дозволяє визначити, які структурні елементи білка забезпечують колокалізацію з Bcr-Abl, що є ключовим для функціонування білкових комплексів і потенційної резистентності клітин до інгібіторів тирозинкінази. Дослідження домен-залежної експресії USP1 у клітинах K562 сприяє уточненню механізмів стабілізації Bcr-Abl та надає основу для розробки таргетних терапевтичних стратегій, орієнтованих на протеасомну деградацію онкобілка.

Метою дослідження є створення рекомбінантних генетичних конструкцій плазмід pECFP-C3-USP1-domain-1 і pECFP-C3-USP1-domain-2, що кодують окремі домени USP1, та оцінка їх експресії і колокалізації з Bcr-Abl у клітинах K562 для визначення функціональної ролі доменів у формуванні білкових

комплексів. Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні **завдання:**

- Розробити та отримати рекомбінантні плазмідні конструкції pECFP-C3-USP1-domain-1 і pECFP-C3-USP1-domain-2.
- Виконати трансфекцію конструкцій у клітини K562 і забезпечити експресію окремих доменів USP1.
- Провести імуофлуоресцентне фарбування та конфокальну мікроскопію для візуалізації білків.
- Здійснити кількісний аналіз колокалізації доменів USP1 з Bcr-Abl та визначити домен з найбільш вираженими показниками колокалізації.
- Оцінити значення доменної організації USP1 для формування білкових комплексів і потенційного терапевтичного застосування.

Об'єктом дослідження є білок USP1, зокрема його доменна організація.

Предмет дослідження є молекулярні механізми функціонування білка USP1 у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії людини.

Методи дослідження:

- Молекулярне клонування: ампліфікація кодуючих послідовностей доменів USP1, вставка у плазмідний вектор, рестрикційний аналіз та секвенування.
- Трансформація *E. coli* TOP10 та виділення плазмідної ДНК для подальшої трансфекції клітин.
- Клітинні методи: культивування клітин K562, трансфекція, експресія доменів.
- Імуофлуоресцентне фарбування та конфокальна мікроскопія для візуалізації та кількісного аналізу колокалізації.
- Статистична обробка отриманих даних.

Інформаційна база дослідження включає наукові публікації, бази даних білкових структур, результати експериментальних досліджень ХМЛ, методичні рекомендації та матеріали міжнародних наукових конференцій.

Наукова новизна роботи:

- 1) Вперше створено рекомбінантні плазмідні конструкції, що кодують окремі домени USP1, для клітин K562.
- 2) Встановлено домен-залежну експресію USP1 та її колокалізацію з Bcr-Abl, виявлено, що домен USP1-domain-2 демонструє кращі показники взаємодії.
- 3) Виявлено структурно-функціональні особливості USP1, що впливають на формування білкових комплексів і потенційно визначають резистентність клітин до терапії.

Практичне значення. Створені конструкції можуть використовуватися для подальших досліджень білкових взаємодій у клітинах ХМЛ. Отримані результати можуть слугувати підґрунтям для розробки нових таргетних терапевтичних стратегій, спрямованих на домен-залежну регуляцію USP1 і Bcr-Abl.

Апробацію наукових результатів здійснено на міжнародних та всеукраїнських наукових конференціях: III Всеукраїнська науково-практична інтернет-конференція «Освітньо-наукові інновації у сфері біології, збереження здоров'я людини та психосоціальної і фізичної реабілітації» (15 листопада 2024 року, м. Рівне, Україна); IV Всеукраїнська науково-практична онлайн-конференція «Інноваційні практики наукової освіти» (11–16 грудня 2024 року, м. Київ, Україна); XVI Всеукраїнська науково-практична конференція для молодих учених та здобувачів освіти «Сучасні інформаційні технології в освіті і науці» (10-11 квітня 2025 року, м. Умань, Україна); Міжнародна науково-практична конференція здобувачів вищої освіти і молодих учених «Інформаційні технології в сучасному світі» (29 квітня 2025 року, м. Харків, Україна); Міжнародна наукова конференція «Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування» (14-15 травня 2025 року, м. Харків, Україна); XIX Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (20-21 травня 2025 року, м. Київ, Україна); XX Міжнародна наукова конференція «Фактори експериментальної еволюції організмів» (22–26 вересня 2025 р., м. Київ, Україна).

Публікації. Результати досліджень опубліковано у статті та тезах у фахових

виданнях. Бібліографія опублікованих робіт:

Matvieienko A. S., Antonenko S. V., Guryanov D. S., G. D. Teleguev. Generation of recombinant constructs pECFP-C3-USP1-domain-1 and pECFP-C3-USP1-domain-2 as key tools for studying the domain organization of USP1 and its interaction with the oncoprotein Bcr-Abl. *Molecular genetics and genomics*. Vol 36, 2025. С.69-74. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v36.1715> (ДОДАТОК А).

Matvieienko A.S., Antonenko S.V., Guryanov D.S., Teleguev G.D. Creation of genetic constructs pECFP-C3-USP1-domain-1 and pECFP-C3-USP1-domain-2 for analysis of the functional role of USP1 domains and their role in the formation of the USP1/Bcr-Abl protein complex in chronic myeloid leukemia cells. *Book of Abstracts of XIX All-Ukrainian Conference of Young Scientists. May 20–21, 2025, Kyiv, Ukraine*. P. 60. (ДОДАТОК Б).

Матвєєнко А.С., Грецький І.О. Застосування мови програмування R для ефективного вивчення біоінформатики та аналізу біологічних даних // Матеріали III Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції «Освітньо-наукові інновації у сфері біології, збереження здоров'я людини та психосоціальної і фізичної реабілітації» (15 листопада 2024 р. м. Рівне). С. 123-130. (ДОДАТОК В).

Матвєєнко А.С., Грецький І.О. Мова програмування R як зручна платформа для планування дослідження та аналізу результатів біологічних експериментів // Матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Інноваційні практики наукової освіти» (11–16 грудня 2024 року, м. Київ). С. 544-548. (ДОДАТОК Г).

Матвєєнко А.С., Грецький І.О. Можливості дизайну біотехнологічних експериментів у середовищі R. // Матеріали XVI Всеукр. наук.-практ. конф. для молодих учених та здобувачів освіти «Сучасні інформаційні технології в освіті і науці» (10-11 квіт. 2025 р., м. Умань). С.152-155. (ДОДАТОК Д).

Матвєєнко А.С., Грецький І.О. Метааналіз біологічних даних за допомогою інструментів мови програмування R. // Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції здобувачів вищої освіти і молодих учених «Інформаційні технології в сучасному світі» (29 квітня 2025 р., м. Харків). С.328-

330. (ДОДАТОК Е).

Матвєєнко А.С., Грецький І.О. Мова програмування R як платформа для машинного навчання і аналізу даних біологічних досліджень. // Матеріали Міжнародної наукової конференції «Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування» (14-15 травня 2025 р., м. Харків). С.344-346. Режим доступу: <http://btu.kharkov.ua/nauka/konferentsiyi/>. **(ДОДАТОК Ж).**

Структура і обсяг магістерської роботи. Основна частина дипломної магістерської науково-дослідницької роботи викладена на 59 сторінках, і включає три основні розділи та висновки. В роботі представлено список використаних джерел, що налічує 67 найменувань публікацій вітчизняних та зарубіжних дослідників.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Хронічна мієлоїдна лейкемія: історія, патогенез, клінічні фази та існуючі підходи до лікування

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) – це клональне мієлопроліферативне захворювання, що виникає у гемопоетичних стовбурових клітин внаслідок специфічної генетичної аномалії – реципрокної хромосомної транслокації t(9;22), що відбувається внаслідок злиття гена Абелясона (ABL1) з хромосоми 9q34 з геном кластерної області точки розриву (BCR) на хромосомі 22q11.2, утворюючи так звану філадельфійську (Ph) хромосому (рис.1.1). Молекулярним наслідком цієї транслокації є формування злитого онкогену Bcr-Abl, який кодує конститутивно активну тирозинкіназу. Аномальна активність цієї кінази визначає патогенез ХМЛ. Передача сигналів кінази активує наступні мішені, які перепрограмовують клітину, щоб викликати неконтрольовану проліферацію, що призводить до мієлоїдної гіперплазії та слабо виражених симптомів хронічної фази ХМЛ, а також геномної нестабільності та уникнення апоптозу [1, 2].

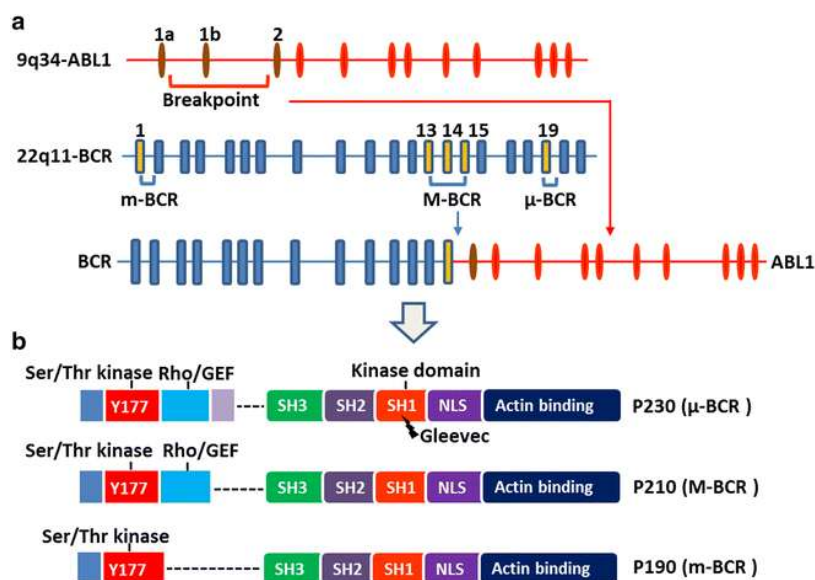


Рис.1.1 а - Реципрокна хромосомна транслокація t(9;22) - злиття гена Абелясона (ABL1) хромосоми 9q34 з геном кластерної області точки розриву (BCR) на хромосомі 22q11.2, з утворенням філадельфійської хромосоми. b – ізоформи білка Bcr- Abl [3].

1.1.1 Історичний розвиток наукових уявлень про хронічну мієлоїдну лейкемію

Формування сучасних уявлень про хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ) є результатом тривалої еволюції поглядів, що бере початок з описової клінічної гематології та продовжується на сьогоднішній день становленням молекулярно-орієнтованої онкогематології. Перші спроби виділити ХМЛ як окрему форму мієлопроліферативного захворювання виникли ще у XIX столітті, їх характер був лише фенотиповим: значна спленомегалія, виражений лейкоцитоз і поступове виснаження пацієнта створювали основу для диференційної діагностики, але не давали уявлення про внутрішні механізми патологічного процесу. Поява цитогенетики у середині XX століття започаткувала концептуальний перехід від морфологічної типології до молекулярної характеристики ХМЛ.

Важливою віхою, що стала фундаментом усієї подальшої наукової парадигми, було відкриття Пітера Новела і Девіда Хангерфорда, які у 1960 році описали нову хромосомну аномалію в клітинах кісткового мозку пацієнтів із цим захворюванням. Ця аномалія отримала назву філадельфійської хромосоми (Ph-хромосома) на честь міста, де було проведено відкриття [4, 5]. Це спостереження, попри свою відносну простоту, вперше продемонструвало існування чітко окресленої генетичної ознаки у гематологічній неоплазії. Через понад десятиліття, у 1973 році, завдяки роботі Дж. Роулі, було встановлено, що Ph-хромосома є результатом реципрокної транслокації $t(9;22)(q34;q11)$ [4, 6]. Цей факт змінив саму логіку інтерпретації онкогематологічних процесів, вписавши ХМЛ у ширший контекст хромосомних аномалій як рушійної сили канцерогенезу.

Молекулярна природа наслідків цієї транслокації була розкрита у 1980-х роках. Саме тоді було показано, що транслокація хромосом призводить до утворення гібридного гена BCR-ABL1, який кодує тирозинкіназу з аномально високою конститутивною активністю. Подальші дослідження продемонстрували, що Bcr-Abl здатний неконтрольовано активувати низку сигнальних шляхів (RAS/MAPK, PI3K/AKT, JAK/STAT), що забезпечує підсилення проліферації, пригнічення апоптозу та порушення диференціювання мієлоїдних клітин. Уперше

було чітко встановлено, що одна молекулярна подія може бути достатньою для ініціації злоякісної трансформації, що стало ключовим аргументом на користь розвитку таргетної терапії [7].

До впровадження таргетної терапії лікування ХМЛ залишалося переважно паліативним. У середині XX століття застосовували рентгенотерапію, подальшою терапевтичною опорою стали алкілюючі агенти, зокрема бусульфан та гідроксикарбамід. Запровадження інтерферону- α у 1980-х роках стало першим кроком до покращення виживаності, однак значної трансформації клінічного прогнозу не відбулося. Єдиним потенційно дієвим методом залишалася аlogenна трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин, яка, попри високу ефективність, мала суттєві обмеження через значну токсичність і потребу у відповідному донорі [8].

Справжня революція у лікуванні хронічної мієлоїдної лейкемії розпочалася з розробкою селективних інгібіторів тирозинкінази (ІТК). У 1990-х роках було доведено, що химерний білок Bcr-Abl має постійну тирозинкіназну активність, що забезпечує неконтрольовану проліферацію мієлоїдних клітин [8]. Ці фундаментальні відкриття дали змогу створити специфічну терапевтичну молекулу - іматиніб, який у 2001 році був схвалений як перший таргетний препарат для лікування ХМЛ. Впровадження іматинібу стало історичним проривом: захворювання, яке раніше вважалося невиліковним без трансплантації, перетворилося на хронічно контрольований стан. Подальший розвиток галузі привів до появи інгібіторів другого (дазатиніб, нілотиніб, босутиніб) та третього покоління (понатиніб, азімініб), які забезпечили ефективне лікування при резистентності та значно розширили можливості персоналізованої терапії [4, 9, 10].

Клінічні рекомендації European LeukemiaNet (ELN) 2020 систематизували підходи до молекулярного моніторингу, визначили критерії відповідей і навіть передбачили можливість контрольованого припинення терапії у хворих із стійкою глибокою молекулярною ремісією [11].

Однак, використання ІТК викликає велику кількість небажаних побічних

ефектів, тому дослідники не зупинились на досягнутому і почали активно вивчати пост-трансляційні механізми регуляції Bcr-Abl та споріднених сигнальних комплексів, зокрема убіквітинуювання й деубіквітинуювання. Одним із молекулярних напрямів, що привернули увагу у 2020-х роках, стало дослідження значення деубіквітиназ - ферментів, які модулюють стабільність білків шляхом зняття убіквітинових міток. Серед них ubiquitin-specific protease 1 (USP1) зайняв особливе місце завдяки своїй участі у контролі репарації ДНК та регуляції клітинного циклу. Поступове накопичення даних про роль USP1 у різних видах пухлин призвело до формування гіпотези про її потенційну співучасть у підтримці патологічного фенотипу клітин ХМЛ [12].

Перші експериментальні роботи, які безпосередньо пов'язали USP1 із функціонуванням Bcr-Abl, з'явилися близько 2020 року. Дослідники продемонстрували, що USP1 може утворювати білковий комплекс із Bcr-Abl у клітинах лінії K562, що свідчить про її залучення до регуляції стабільності онкопротеїну. Фармакологічне інгібування USP1 (наприклад, ML323) або її генетичне пригнічення призводило до зменшення кількості Bcr-Abl на білковому рівні, що супроводжувалося порушенням проліферативного потенціалу клітин, збільшенням апоптозу та зниженням виживаності. Таким чином уперше було показано, що деубіквітиназа може виконувати роль «стабілізаційного буфера», який захищає Bcr-Abl від протеосомної деградації [13, 14].

Подальші систематичні огляди 2021–2024 рр. підтвердили, що підвищена активність USP1 характерна для низки гематологічних неоплазій та що її інгібіція може підсилювати цитотоксичний ефект інших протипухлинних препаратів. Зокрема, встановлено, що USP1 бере участь у підтриманні стабільності таких онкогенних регуляторів, як ID1 та c-MYC, що створює умови для проліферативної переваги та порушення апоптотичного контролю. Це дозволило висунути припущення, що USP1 може слугувати одним із «підтримуючих вузлів» онкогенної мережі Bcr-Abl-позитивних клітин [15,16].

Паралельно з фундаментальними дослідженнями активно розвивається терапевтичний напрям. У 2023–2024 роках було повідомлено про перехід низки

інгібіторів USP1 (наприклад, KSQ-4279, RO7623066) до доклінічної та ранньої клінічної оцінки. Дані, отримані в експериментальних моделях, свідчать, що інгібіцію USP1 потенційно можна комбінувати з ІТК для подолання резистентності або досягнення глибших молекулярних відповідей. Саме тому вивчення USP1 розглядають одним з перспективних напрямів майбутніх досліджень у контексті ХМЛ [17].

На сьогоднішній день роль USP1 у патогенезі ХМЛ розглядається як елемент комплексної системи посттрансляційної регуляції, що визначає стабільність онкомутаційних білків. Очевидним є потреба у подальшому поглибленні досліджень: необхідно з'ясувати, які саме домени USP1 колокалізуються із Bcr-Abl, визначити специфічні убіквітинові ланцюги, задіяні у стабілізації онкогена, описати часопросторову динаміку цього комплексу та оцінити потенціал комбінованих терапевтичних режимів.

1.1.2 Епідеміологія

Хронічна мієлоїдна лейкемія є мієлопроліферативним новоутворенням, яке становить приблизно 15-20% усіх випадків лейкемій у дорослих, а його частота складає 1-2 випадки на 100 000 осіб на рік [2]. За даними на травень 2025 року приблизна кількість людей у світі, які хворіють на ХМЛ становить 5 мільйонів осіб [9]. Захворювання частіше діагностують у людей середнього віку (50-60 років), хоча воно може виникати в будь-якому віці [18].

1.1.3 Патогенез та клінічні стадії ХМЛ

Клінічними ознаками ХМЛ є лейкоцитоз, зсув диференційної формули вліво (збільшення кількості і пропорції паличкоядерних нейтрофілів, поява молодих форм, таких як метамієлоцити (юні) і мієлоцити та як наслідок - відносне зниження вмісту лімфоцитів) та спленомегалія [19, 20].

ХМЛ має три стадії розвитку хвороби.

1. Хронічна фаза (ХФ):

- Діагностується у 90% випадків.

- Характеризується лейкоцитозом, наявністю незрілих гранулоцитів у периферичній крові, спленомегалією та слабо вираженими симптомами.
- Клінічні прояви на цій фазі, як правило, слабо виражені, і значна частина хворих (близько 40%) залишається безсимптомною. У багатьох випадках захворювання виявляють випадково під час проведення загального аналізу крові.
- Фаза може тривати кілька років, вона характеризується розширенням компартменту мієлоїдних клітин, які зберігають здатність до диференціювання та нормального функціонування.
- При своєчасній діагностиці захворювання та початок лікування призводить до уповільнення прогресування хвороби [19, 21].

2. Прискорена фаза (ПФ):

- Відзначається підвищенням кількості бластів (від 10% до 19% у кістковому мозку або крові).
- Погіршенням клінічного стану, частими інфекціями, анемією, тромбоцитопенією.

3. Бластний криз (БК):

- Бластний криз характеризується розвитком прогресивного збільшення кількості бластів, цитопеній і придбанням генетичної нестабільності, що призводить до накопичення генетичних/цитогенетичних дефектів та підвищення ймовірності резистентності до ліків. На кінцевій стадії переважають незрілі клітини, а виживаність вимірюється місяцями [19, 21].

Перехід від хронічної фази до бластного кризу є складним і може включати вторинні хромосомні зміни, які можуть сприяти злоякісному фенотипу, вони включають подвоєння Ph-хромосоми, трисомію і мутації або делеції генів-супресорів пухлин, таких як p53 або p16. Ці вторинні молекулярні та хромосомні зміни сприяють збільшенню проліферації, підвищенню виживаності, геномній нестабільності та зупинці диференціювання, відмінній рисі бластної кризи. Набуття гранулоцитарно-макрофагальними попередниками здатності до

самовідновлення через активацію шляху бета-катеніну відбувається під час переходу ХМЛ від хронічної фази до бластного кризу [19, 22].

1.1.4 Діагностика ХМЛ

Діагноз хронічної мієлоїдної лейкемії встановлюють на підставі виявлення характерних цитогенетичних аномалій, визначення транскрипту Bcr-Abl методом зворотної транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) або ідентифікації Ph-хромосоми за допомогою флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH). ЗТ-ПЛР також використовується для відстеження відповіді на лікування шляхом оцінки молекулярної відповіді (MR), яка визначається як співвідношення транскриптів BCR-ABL до ABL1 згідно з міжнародною шкалою (IS). $MR \leq 1\%$ вважається повною цитогенетичною ремісією, тоді як $MR \leq 0,1\%$ вказує на головну молекулярну відповідь (MMR) або MR. Молекулярно недетектована лейкемія характеризується рівнем транскриптів BCR-ABL, який становить $\leq 0,0032\%$, або відповідним показником молекулярної ремісії (MR) [4].

1.1.5 Методи лікування хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ)

Метою лікування ХМЛ є запобігання прогресуванню захворювання до більш пізніх стадій, зниження ризику смерті, продовження життя пацієнта до тривалості, характерної для загальної популяції, та покращення якості життя. Дані цілі досягаються шляхом максимального зменшення кількості Ph⁺ клітин. Схема терапії залежить від фази захворювання на момент встановлення діагнозу. На сьогоднішній день існує декілька основних підходів у лікуванні ХМЛ, одним із головних є застосування інгібіторів тирозинкінази.

Інгібітори тирозинкінази (ІТК) - це клас лікарських засобів, що блокують активність тирозинкіназ - ферментів, які беруть участь у передачі сигналів росту та розмноження клітин, зокрема онкобілка Bcr-Abl, що є специфічною мішенню при ХМЛ [22]. Існує три покоління ІТК, кожне з яких має свої переваги, недоліки та механізм дії.

1.1.5.1 Інгібітори тирозинкіназ першого покоління

Першим представником інгібіторів тирозинкіназ є іматиніб (STI571), який став основою лікування ХМЛ, перетворивши цю смертельну хворобу на керовану хронічну патологію [23]. Іматиніб є 2-феніламінопіримідиною сполукою, що селективно інгібує Bcr-Abl, блокуючи зв'язування аденозинтрифосфату (АТФ) з активним центром тирозинкінази [22]. Це призводить до припинення неконтрольованого росту клітин лейкемії, не впливаючи на здорові клітини [23].

Ефективність іматинібу була підтверджена у масштабному дослідженні IRIS, яке показало значну перевагу препарату над інтерфероном за частотою гематологічної та цитогенетичної відповіді [22]. Препарат був схвалений FDA у 2001 році для лікування пацієнтів із Ph⁺ ХМЛ [23]. Рекомендована доза становить 400 мг на добу перорально.

Однак, тривале застосування іматинібу може призводити до розвитку лікарської резистентності через появу мутацій у BCR-ABL або недостатню концентрацію препарату у плазмі крові [23]. Основні побічні ефекти включають нудоту, м'язові судороги, набряки та мієлосупресію [22, 24].

1.1.5.2 Інгібітори тирозинкіназ другого покоління

Інгібітори тирозинкіназ другого покоління - дазатиніб, нілотиніб, босутиніб - були розроблені для подолання резистентності до іматинібу та підвищення ефективності лікування. Вони демонструють швидшу та глибшу молекулярну відповідь і знижують ризик прогресування ХМЛ [22].

Дазатиніб (BMS-354825) - це потужний ІТК, який зв'язується з активною та неактивною формами Bcr-Abl, що робить його ефективним проти більшості мутацій, за винятком T315I [23]. У 2007 році він був схвалений FDA для застосування у пацієнтів із резистентністю до іматинібу [22]. Проте дазатиніб має побічні ефекти, такі як плевральний випіт, мієлосупресія та легенева гіпертензія [23].

Нілотиніб (AMN107) - селективний інгібітор, що зв'язується з неактивною конформацією Bcr-Abl, у 20 – 50 разів потужніший за іматиніб [10]. Він був

схвалений у 2007 році як засіб другої лінії терапії [23]. Недоліком є підвищення ризику серцево-судинних ускладнень, таких як подовження інтервалу QT та гіперглікемія [22].

Босутиніб (SKI-606) – є одним з представників препаратів ІТК другого покоління, що активний проти більшості мутацій, окрім T315I [22]. Дослідження BELA підтвердило його ефективність у досягненні молекулярної відповіді. Найпоширенішими побічними ефектами є діарея, нудота та підвищення рівня печінкових ферментів [19, 22, 23, 24].

1.1.5.3 Інгібітори тирозинкіназ третього покоління

Понатиніб (AP24534) - ІТК третього покоління з потужною активністю проти нативного Bcr-Abl та клінічно значущих резистентних мутантів, із точковою мутацією T315I в гені BCR-ABL - найбільш резистентною до інших ІТК [22, 25]. Дослідження PACE (Ponatinib Ph+ ALL and CML Evaluation) показало, що понатиніб забезпечує тривалу гематологічну та цитогенетичну відповідь навіть у пацієнтів із множинними мутаціями [23, 25]. Однак він пов'язаний із серйозними побічними ефектами, такими як: тромбоемболічні ускладнення, тромбоцитопенія, панкреатит, гіпертензія, головний біль, болі у черевній порожнині, запори, сухість шкіри та висипи тощо, що вимагає ретельного моніторингу стану пацієнтів при застосуванні препарату. Остаточні результати PACE демонструють, що понатиніб забезпечує стійкі та клінічно значущі відповіді навіть при зниженні дози препарату для популяції пацієнтів, які отримували попереднє лікування з великою кількістю препарату [22, 25, 26].

1.1.5.4 Аутофагія та деякі інші сучасні альтернативні підходи боротьби з ХМЛ

Аутофагія - це природний процес деградації та утилізації пошкоджених органел і білків у клітині за допомогою лізосом. Вона відіграє двояку роль у патогенезі ХМЛ: з одного боку, сприяє виживанню клітин при стресі, з іншого - може використовуватися як мішень для посилення ефективності ІТК [22].

Інгібування аутофагії в поєднанні з препаратами ІТК може підвищити чутливість лейкемічних клітин до терапії та зменшити ризик рецидиву. Це відкриття є перспективним для розробки нових комбінованих підходів до лікування ХМЛ, однак необхідно провести більш масштабні дослідження [4].

Лікування ХМЛ за допомогою ІТК є ефективним та значно покращує прогноз для пацієнтів. Вибір препарату залежить від стадії захворювання, наявності мутацій та індивідуальної переносимості терапії. Незважаючи на досягнуті успіхи, основною проблемою залишається розвиток резистентності та токсичність, що обґрунтовує необхідність пошуку нових терапевтичних підходів [4, 22, 23].

Саме тому шляхом експериментальних досліджень було запропоновано альтернативні підходи боротьби з ХМЛ, зокрема за участю інгібіторів білка теплового шоку 90 (Hsp90), гістондеацетилаз, активаторів PP2A та ін. Вони здатні впливати на експресію та стабільність Bcr-Abl, проте більшість цих сполук має низьку селективність до субстрату, підвищену токсичність та потребують тривалих доклінічних випробувань [14].

На сьогоднішній день активно розвиваються підходи молекулярно-цільової терапії, спрямовані на використання селективних протеаз для модулювання рівня онкобілка Bcr-Abl, що є ключовою рушійною силою патогенезу хронічної мієлоїдної лейкемії. Такі стратегії мають низьку переваг, зокрема низьку чутливість до мутацій, можливість селективного протеолізу Bcr-Abl через клітинні системи деградації та потенціал для тривалої ремісії, включно з подоланням мінімального залишкового захворювання. На цьому тлі особливо перспективними виглядають терапевтичні підходи, засновані на використанні білків родини USP. Доведено, що USP відіграють важливу роль у регуляції стабільності онкобілків, контролі репарації ДНК та формуванні імунного мікрооточення пухлини, що робить їх універсальними мішенями для протипухлинної терапії. USP здатні не лише поглиблювати порушення у шляхах репарації ДНК та підвищувати чутливість клітин до генотоксичних агентів, але й модулювати протипухлинну імунну відповідь, підсилюючи ефективність

сучасних імунотерапій. Незважаючи на те, що більшість інгібіторів USP перебувають на доклінічній стадії, декілька сполук USP1 вже проходять клінічні випробування 1 та 2 фаз, демонструючи перспективні дані щодо безпеки, переносимості та протипухлинної активності. Сукупність цих результатів формує підґрунтя для створення нового класу таргетних препаратів, здатних доповнити або посилити існуючі методи лікування ХМЛ, зокрема у пацієнтів із резистентністю до інгібіторів тирозинкінази та зберіганням мінімального залишкового захворювання [14, 22, 27].

1.2 Онкобілок Bcr-Abl як ключовий фактор у патогенезі хронічної мієлоїдної лейкемії

Онкобілок Bcr-Abl є продуктом злиття генів BCR (breakpoint cluster region) та ABL1 (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1), що виникає внаслідок реципрокної хромосомної транслокації t(9;22)(q34;q11), відомої як Філадельфійська хромосома (Ph). Цей онкобілок відіграє вирішальну роль у патогенезі хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ) та деяких інших видах лейкемічних хвороб, наприклад, таких як В-клітинний гострий лімфобластний лейкоз (B-ALL) [14, 19].

1.2.1 Молекулярна біологія хронічної мієлоїдної лейкемії

Ph-хромосома утворюється реципрокною t(9;22) (q34;q11) транслокацією між довгими плечами хромосом 9 і 22, викликаючи сусідство генів BCR і ABL1. Злитий ген BCR-ABL1 складається з 5' -кінець гена BCR (область кластерної точки розриву) і 3'-кінець гена ABL1 (також відомого як Abelson). Розташування точок розриву генів BCR і ABL1 дуже варіабельне, але рекомбінація зазвичай включає злиття інтрона 13 або 14 BCR з ділянкою ABL1 розміром 140 кілобаз (kb) між екзонами 1b і 2 (рис.1.2 а) . Незалежно від розташування точки розриву в гені ABL1, сплайсинг мРНК призводить до основних транскриптів BCR-ABL1 із з'єднаннями e13a2 (екзон BCR 13 і екзон 2 ABL1) або e14a2. Ці транскрипти спочатку називалися b2a2 і b3a2 відповідно. Обидва транскрипти призводять до

експресії білка 210 кДа Bcr-Abl [1].

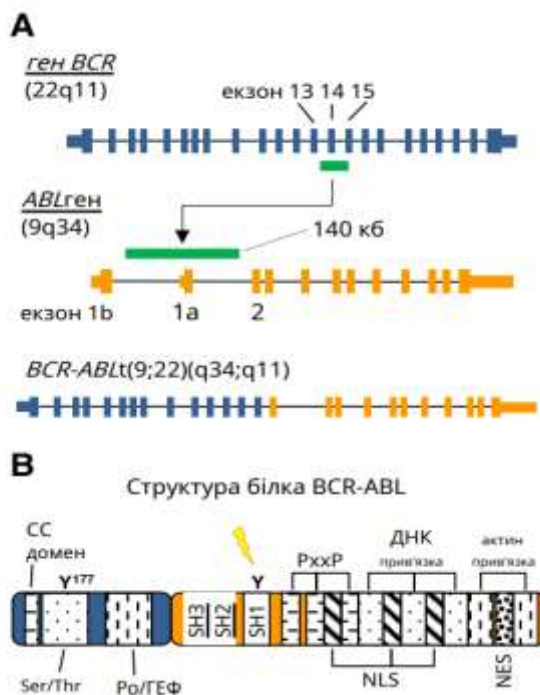


Рис. 1.2 Структура гена та білка BCR-ABL. **a** - Злитий ген BCR-ABL складається з 5'-кінець гена BCR і 3'-кінець ABL1. Локація транслокації зазвичай передбачає злиття інтрона 13 або 14 BCR із 140-кілобазою (kb) область ABL1 між екзонами 1b і 2. **b** - Білок Bcr-Abl містить димеризацію або спіраль (CC) домен Ser/Thr кінрази та Rho/GEF домен BCR, а також SH-домени, багаті проліном (PxxP), сигнал ядерної локалізації (NLS), ДНК-зв'язування, ядерний експортний сигнал (NES) і актинозв'язувальні домени з ABL. Залишки тирозину в доменах кінрази Ser/Thr та SH1 були виділені [1].

1.2.2 Структура білка Bcr-Abl

Білок Bcr-Abl вагою 210 кДа, який спостерігається при хронічній мієлоїдній лейкемії, містить більше десяти білкових доменів (рис.1.2.1.1б). Bcr-Abl містить кінразу Ser/Thr, Rho/GEF і димеризацію (спіраль) доменів від BCR, і зливається з SH, багатим проліном (PxxP), ДНК- та актин-зв'язуючими доменами, а також ядерною локалізацією та сигналами входу від ABL1 [1].

Білок Bcr-Abl складається з доменів, отриманих з обох батьківських білків. Від білка BCR він успадковує:

- N-кінцевий спіральний (олігомеризаційний) домен;

- домен серин/треонін кінази, що містить док-сайт (фосфорильований тирозин 177, Y177) для білка 2, пов'язаного з рецептором фактора росту адаптерного білка (GRB2);
- p210 Bcr-Abl також зберігає домен кінази сімейства генів гомологів Ras/гуанін-нуклеотидних факторів обміну (Rho/GEF);
- ізоформа p230 Bcr-Abl додатково містить домен, що зв'язує кальцій. Від білка ABL1 він успадковує:
- три домени гомології SRC (SH3, SH2, SH1) – SH1 є доменом кінази, тоді як домени SH2 і SH3 опосередковують взаємодію з іншими білками;
- довга С-кінцева область, що містить збагачені проліном послідовності, ДНК-зв'язуючий домен та актин-зв'язуючий домен.

Важливою особливістю Bcr-Abl є втрата N-кінцевого сайту міристоїлювання ABL1, що призводить до конститутивної активації тирозинкіназного домену SH1 [19]. Ділянка тирозинкінази SH1 є найбільш вивченим доменом Bcr-Abl через його невід'ємну роль у патогенезі ХМЛ. Однак інші особливості, такі як трирозин-177 у домені кінази Ser/Thr, також є невід'ємною частиною функції Bcr-Abl. Хоча Bcr-Abl містить більшу частину гена ABL1, у ньому відсутня послідовність, яка кодує N-кінцевий сайт міристоїлювання ABL1. Вважається, що втрата цього фрагмента частково відповідає за активність конститутивної кінази Bcr-Abl. Для нормального білка ABL1 міристоїлювання його N-кінця та наступне цис-зв'язування в кишені зв'язування міристоїлювання ABL1 викликає автоінгібування активності кінази SH1. Оскільки Bcr-Abl зберігає кишеню зв'язування міристоїлювання, було випробувано, що сполуки, націлені на цей мотив, інгібують активність кінази Bcr-Abl. Ці сполуки демонструють багатообіцяюче алостеричне інгібування активності Bcr-Abl і можуть посилити можливості терапевтичного націлювання Bcr-Abl [1].

1.2.3 Ізоформи Bcr-Abl

Залежно від точної точки розриву транслокації в межах BCR-гена, генеруються різні злиті гени, що призводять до синтезу різних білків. Найбільш

поширені транслокації генерують злиті білкові продукти з молекулярною масою 190, 210 та 230 кДа. Ці варіанти, позначаються як p190, p210, p230, вони викликають різні клінічні прояви.

1) p210 Bcr-Abl: утворюється внаслідок злиття екзонів BCR та ABL1 в області основної точки розриву (M-bcr) гена BCR. Ця ізоформа є найбільш характерною для хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ).

2) p190 Bcr-Abl: утворюється внаслідок злиття екзонів BCR та ABL1 в області мінорної точки розриву (m-bcr) гена BCR. Ця ізоформа частіше зустрічається при гострому лімфобластному лейкозі (B-ALL).

3) p230 Bcr-Abl: утворюється внаслідок злиття екзонів BCR та ABL1 в області мікро-точки розриву (μ -bcr) гена BCR. Ця ізоформа пов'язана з хронічним нейтрофільним лейкозом [22, 28, 29, 30].

Відмінності в точках розриву та, відповідно, в структурі ізоформ Bcr-Abl, впливають на їх біологічні властивості та патогенетичну роль.

Два типи лейкемії, викликані цими варіантами, демонструють різну відповідь на лікування хіміотерапією, включаючи інгібітори тирозинкінази, що призводить до різних клінічних результатів. Причини цієї невідповідності досі не до кінця вивчені. BCR-ABL злиті гени кодують білки з конститутивно активною тирозинкіназною активністю, які опосередковують трансформацію шляхом індукції сигнальних шляхів, які посилюють ріст клітин і уникають нормальної регуляції. Незважаючи на численні дослідження механізмів, що лежать в основі p190 і p210 Bcr-Abl індукованої лейкемії, фундаментальні питання про те як ці білки залучають різні сигнальні програми, залишаються відкритими.

Основною структурною відмінністю між двома варіантами є наявність двох доменів, які зазвичай зустрічаються у факторах обміну гуанінових нуклеотидів (GEF); домен гомології Dbp (DH), за яким слідує домен гомології Плекстрину (PH) у p210 Bcr-Abl (рис.1.3). Домени DH мають каталітичну активність GEF, а домени PH сприяють міжклітинному націлюванню, включаючи зв'язування з плазматичною мембраною. Абляція активності GEF домену DH або видалення домену PH призводить до фенотипів, подібних до p190, припускаючи, що обидва

домени можуть бути важливими для підтримки p210 Bcr-Abl-специфічних фенотипів. Пряме порівняння p190 Bcr-Abl і p210 Bcr-Abl в *in vitro* аналізі активності кінази показав, що p190 Bcr-Abl виявляє більш високий рівень автофосфорилування, що призводить до висновку, що p190 Bcr-Abl ймовірно, більш активна кіназа [22, 28].



Рис. 1.3 Доменна організація Bcr-Abl. Дві ізоформи злитого білка Bcr-Abl, p210 і p190, показані з їхніми розмірами та розташуванням доменів. Точка розриву між Bcr і Abl позначена пунктирною лінією. CC coiled-coil, DH Dbl-гомологія, PH Pleckstrin-гомологія, SH3/SH2 Src-гомологія 3/2, домен зв'язування F-актину FABD [31].

Будучи частиною блоку DH–PH, домен PH бере участь у багатьох функціях, включаючи локалізацію на мембрані, алостеричну модуляцію активності GEF і в деяких випадках прямий внесок у активність DH GEF [31].

1.2.4 Локалізація та функції Bcr-Abl

Bcr-Abl є конститутивно активною тирозинкіназою, яка зазвичай локалізується в цитоплазмі клітин та активує численні сигнальні шляхи, що регулюють ріст, виживання і диференціацію клітин [32]. Основні функції Bcr-Abl включають:

- стимуляцію проліферації лейкемічних клітин;
- пригнічення апоптозу (запрограмованої загибелі клітин);
- порушення адгезії клітин до стромы кісткового мозку;
- активацію сигнальних шляхів RAS/MAPK, PI3K/Akt та JAK/STAT.

Ці функції сприяють неконтрольованому росту та виживанню лейкемічних

клітин, що призводить до розвитку лейкемії [1, 3, 19].

1.2.5 Механізми дії Bcr-Abl

Два основні механізми були залучені в злоякісну трансформацію Bcr-Abl:

- 1) змінена адгезія до клітин стромы кісткового мозку та позаклітинного матриксу;
- 2) конститутивно активна мітогенна передача сигналів і знижений апоптоз.

Онкопротеїн Bcr-Abl активує низку внутрішньоклітинних сигнальних каскадів, які забезпечують прогресію хронічної мієлоїдної лейкемії. Серед них ключову роль відіграють шляхи RAS/RAF/MEK/ERK, JAK2/STAT та PI3K/AKT/mTOR. Активація RAS/RAF/MEK/ERK-каскаду сприяє підвищенню проліферативної активності клітин та їхній нечутливості до регуляторних сигналів. Шлях JAK2/STAT забезпечує транскрипційну активацію генів, пов'язаних із ростом і виживанням клітин, тоді як PI3K/AKT/mTOR-каскад відіграє провідну роль у підтриманні клітинної життєздатності, інгібуванні апоптозу та метаболічній перебудові клітини. Сукупна дія цих сигнальних шляхів призводить до фосфорилування численних білків-мішеней, що координують клітинний цикл, апоптоз та інші критично важливі процеси, забезпечуючи таким чином трансформацію та неконтрольоване виживання лейкемічних клітин [19].

1.2.6 Клінічне значення Bcr-Abl

Виявлення Bcr-Abl є важливим для діагностики ХМЛ та інших Ph-позитивних лейкемій. На даний момент для терапії ХМЛ використовують інгібітори тирозинкінази (ІТК). Їх застосовують як препарати для цільової терапії, яка блокує специфічну тирозинкіназу, що призводить до надмірного вироблення ракових клітин у кістковому мозку, забезпечуючи високу ефективність та покращуючи якість життя пацієнтів з ХМЛ. Однак, у процесі лікування ХМЛ можуть виникати мутації в гені BCR-ABL, особливо в кіназному домені, що зумовлює формування резистентності до інгібіторів тирозинкінази. Саме тому дослідження особливостей функціонування BCR частини онкобілка Bcr-Abl,

зокрема його PH домену, відкриває нові можливості у терапії хронічної мієлоїдної лейкемії, оскільки білок USP1 є потенційним партнером на взаємодію із PH доменом [33].

1.3. Характеристика убіквітин-специфічної протеази-1 (USP1)

1.3.1 Убіквітин-протеасомна система: регуляція, механізми та терапевтичний потенціал

Убіквітин-протеасомна система (UPS) є життєво важливим механізмом регуляції рівня білків в еукаріотичних клітинах, що забезпечує підтримання клітинного гомеостазу. Цей багатоступінчастий ферментативний шлях здійснює цілеспрямовану деградацію субстратних білків через каскад специфічних реакцій.

1.3.1.1 Механізм функціонування UPS

Процес UPS ініціюється активацією убіквітину (Ub) за участі ферменту E1, що активує убіквітин, у АТФ-залежній реакції. Далі убіквітин переноситься на фермент E2, що кон'югує убіквітин, а потім - на лізиновий залишок білків-мішеней за допомогою убіквітинлігази E3. Цей процес повторюється для формування поліубіквітинового ланцюга, який служить сигналом для розпізнавання протеасомою 26S. Протеасома 26S - це мультисубодиничний протеазний комплекс, що включає: 20S корову частинку з протеолітичною активністю та дві 19S регуляторні частинки, які розпізнають убіквітиновані білки. Цей комплекс відповідає за деградацію білків-мішеней до малих пептидів. Важливим регулятором UPS є деубіквітинуючі ферменти (DUB), які видаляють молекули убіквітину з убіквітинованих субстратів, модулюючи стабільність білків [27].

Деубіквітинуючі ферменти (DUB) - це клас протеаз, які забезпечують регуляцію убіквітину шляхом селективного видалення моно- або поліубіквітину з білкових субстратів. Вони відіграють важливу роль у збереженні стабільності білків та регуляції їхньої активності, просторової локалізації, взаємодії з іншими

білками, а також у активації чи пригніченні експресії генів. У людському геномі визначено понад 100 DUB, які є ключовими учасниками підтримання клітинного гомеостазу [34]. Їх фізіологічні функції включають: забезпечення стабільності геному, регуляцію експресії генів, контроль клітинного циклу, проліферацію та диференціацію клітин, передачу сигналів, ендоцитоз, апоптоз тощо [35].

Порушення функції або експресії DUB часто асоціюється з нейродегенеративними та імунними захворюваннями, а також із розвитком онкологічних патологій. Особливий інтерес до DUB викликає їхній потенціал як біомаркерів ракової трансформації та перспективних терапевтичних мішеней у лікуванні злоякісних новоутворень [36].

1.3.1.2 Біологічна роль та значення UPS

UPS бере участь у багатьох ключових клітинних процесах, зокрема:

- відповіді на пошкодження ДНК;
- апоптозі;
- передачі сигналів;
- стійкості до лікарських засобів.

Дисфункція UPS асоціюється з розвитком ряду захворювань, включаючи онкологію. Відомо, що ракові клітини з високим рівнем білкового обміну є більш чутливими до інгібіторів протеасом та деубіквітиназ. Це підкреслює важливість UPS у патогенезі та терапевтичному підході до лікування онкологічних захворювань.

1.3.1.3. Терапевтичні перспективи

Значущість UPS у регуляції клітинних процесів підтверджується успішним використанням інгібіторів протеасом як терапевтичних засобів. Блокування активності протеасом чи DUB може сприяти деградації онкобілків, підвищувати чутливість ракових клітин до стандартних методів лікування, долати резистентність до терапії. Розробка та впровадження інгібіторів UPS відкриває нові можливості у лікуванні онкологічних та інших захворювань, пов'язаних із

порушеннями білкової деградації [27].

Саме тому у нашій роботі особлива увага приділяється одній з найкраще вивчених DUB убіквітин-специфічній протеазі 1 (USP1). Відомо, що підвищена експресія USP1 спостерігається при різних видах онкологічних захворювань, включаючи гліому, остеосаркому, лейкемію, рак шлунка, молочної залози, яєчників, простати та інші форми онкопатологій. Це корелює з агресивністю пухлин і зниженими показниками виживаності пацієнтів. [15].

USP1 бере участь у регуляції ключових клітинних процесів, таких як: метаболізм, проліферація, апоптоз. Основна роль USP1 полягає у підтриманні балансу між убіквітуванням та деубіквітуванням, що важливо для функціонування сигнальних мереж і клітинного гомеостазу. Порушення цього балансу сприяє онкогенезу. USP1 також модулює стабільність онкобілків і білків-супресорів пухлин, що робить його важливим діагностичним маркером і перспективною терапевтичною мішенню для боротьби з онкологічними захворюваннями [36].

1.3.2 Характеристика убіквітин-специфічної протеази USP1

1.3.2.1 Структура USP1

USP1 є членом родини убіквітин-специфічних протеаз (USPs). Цей фермент закодован геном USP1, який локалізований на короткому плечі 1-ї хромосоми, а саме у локусі p31.3-p32.1. Білок USP1 кодується 785 амінокислотами з передбаченою молекулярною масою 88,2 кДа [37].

USP1 містить каталітичний домен, який характеризується багатьма консервативними мотивами. Основний каталітичний домен USP1 включає: C90 - каталітичний залишок С-боксу, H593 і D751 - залишки His-боксу (рис. 1.4). Ці каталітичні залишки утворюють ферментативне ядро активності DUB. Також каталітичний домен USP1 містить додаткові вставки, які моделюють його активність і регуляцію. Перша вставка (L1) кодується 618 п.н, складається з 206 амінокислот та локалізується в межах 227-433 амінокислотних залишків. L1

посилює активність USP1 шляхом зв'язування з ДНК і алостеричної активації при взаємодії з кофактором UAF1, а також бере участь у фосфорилуванні, містить NLS та деградуєчий мотив. Друга вставка (L2) закодована в гені USP1 426 п.н та складається з 142 амінокислот що охоплюють залишки 602-744. L2 містить сайт авторозщеплення, який регулює функцію USP1 [38].

Третя найменша вставка L3 розташована між 465-483 амінокислотними залишками. Вважається, що інсерції L1 і L3 разом здатні викликати аутоінгібування, яке може бути скасовано шляхом зв'язування з кофактором UAF1. Спільна делеція L1 і L3 призводить до гіперактивації USP1, тоді як видалення вставки L2 або L3 не впливає на його ферментативну активність [39]. Скоординована взаємодія між цими вставками, зокрема L1 і L3, керує аутоінгібуванням і активацією USP1, при цьому мутації в цих областях впливають на ферментативну активність. Ці три домени називають каталітичною тріадою USP1, вони є основою для його деубіквітинуючої активності [40].

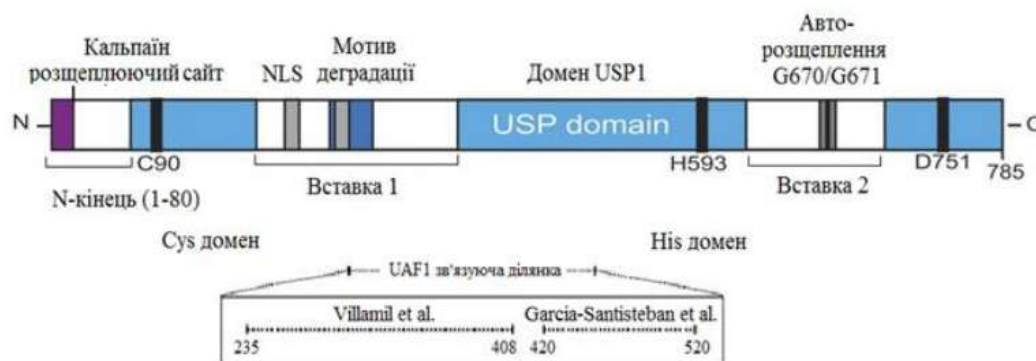


Рис. 1.4 Будова білка USP1. Зображено розташування Cys, His доменів, а також місце кальпайн зв'язуючого сайту, сигнали ядерної локалізації (NLS), UAF1 зв'язуючі ділянки (235-408 та 420-520 амінокислот), мотив деградації білка, сайти авторозщеплення (G670/G671) тощо [14].

1.3.2.2 Функції USP1

Білок USP1 виконує в клітині цілий ряд функцій, а саме:

- Регуляцію цілісності геному, зокрема в системі репарації ДНК (з деубіквітуванням FANCD2).

- Контроль подвоєння центросом та запобігання аномаліям мітотичного поділу.
- Підтримку балансу між убіквітуванням та деубіквітуванням ключових субстратів, таких як PCNA.
- Взаємодію з кофактором UAF1, що значно підвищує каталітичну активність USP1. Білок UAF1 виконує роль кофактора, він стабілізує USP1 та аллостерично збільшує його каталітичну активність, яка є низькою без його участі [14].

1.3.2.3 Роль USP у пухлиноутворенні та прогресуванні раку

Загалом білки USP регулюють кілька критичних шляхів, пов'язаних із онкологічними захворюваннями, включаючи NF- κ B, Wnt/ β -катенін, JAK/STAT, передачу сигналів p53, c-MYC, TGF- β , репарацію ДНК, апоптоз, регуляцію клітинного циклу, MAPK та шляхи гіпоксії. Ці шляхи задіяні в різних аспектах біології раку, таких як проліферація клітин, виживання, метастазування та стійкість до терапії. USP модулюють ці шляхи шляхом деубіквітування ключових субстратних білків, що впливає на їхню стабільність і, як наслідок, на їхні функції. Це регулювання може або сприяти, або гальмувати прогресування раку залежно від конкретного USP та шляху. Різні ролі USP у цих шляхах підкреслюють їх важливість у біології раку та їхній потенціал як терапевтичних мішеней.

USP1 регулює шлях JAK/STAT шляхом модуляції стабільності та деградації ключових сигнальних компонентів, таких як STAT3, який відіграє вирішальну роль у транскрипції. Аберантна активація STAT3 сприяє проліферації пухлинних клітин, посиленню антиапоптозних сигналів, розвитку лікарської резистентності та імунній евізації [27].

1.3.2.4 Локалізація USP1

Вважається, що комплекс USP1/UAF1 утворюється у цитоплазмі і згодом імпортується до ядра за рахунок NLS ділянки USP1 білка. USP1 переважно є

ядерним білком завдяки наявності ядерного сигналу локалізації (NLS) [14].

1.3.2.5 Механізм дії USP1 на онкопротеїн Bcr-Abl

USP1, як деубіквітинуючий фермент, відіграє важливу роль у регуляції стабільності білків шляхом видалення убіквітину. Взаємодія між USP1 та онкобілком Bcr-Abl була підтверджена експериментально методом ко-імунопреципітації білкових комплексів у клітинній лінії K562, отриманій від пацієнтів із хронічною мієлоїдною лейкемією (ХМЛ) [35].

Встановлено, що USP1 взаємодіє з Bcr-Abl через дві ізоформи USP1, тоді як третя ізоформа участі у взаємодії не бере. Ця взаємодія є специфічною, оскільки підтверджується результатами двох експериментальних варіантів: з використанням антитіл проти Bcr-Abl і проти Abl.

Взаємодія USP1 із Bcr-Abl може впливати на стабільність і функцію онкобілка, потенційно змінюючи його активність у сигнальних шляхах, що регулюють проліферацію та виживання клітин.

1.3.2.6. Перспективи використання інгібіторів USP у терапії ХМЛ

Онкопротеїн Bcr-Abl відіграє ключову роль у патогенезі хронічної мієлоїдної лейкемії, зумовлюючи надмірну проліферацію лейкемічних клітин і знижену чутливість до апоптозу. Одним із важливих регуляторів стабільності цього білка є деубіквітинуючий фермент USP1, який здійснює деубіквітування Bcr-Abl і тим самим запобігає його убіквітин-протеасомній деградації. Фармакологічне інгібування USP1 призводить до підвищення рівня убіквітування Bcr-Abl, подальшого протеасомозалежного протеолізу та зниження онкогенного потенціалу клітин. Отже, USP1 розглядається як перспективна терапевтична мішень, інгібування якої може підсилювати ефективність інгібіторів тирозинкінази та зменшувати розвиток резистентності до терапії. Крім того, експресія USP1 потенційно може бути використана як біомаркер для оцінки прогресії ХМЛ та моніторингу відповіді на лікування [14, 35].

Інгібітори деубіквітинуючих ферментів у цілому демонструють значний терапевтичний потенціал. Їх застосування здатне підсилювати дію існуючих протипухлинних методів, зокрема хіміотерапії, таргетної та імунотерапії, за рахунок модуляції пухлинного мікрооточення та підвищення чутливості клітин до імунних впливів.

Попри те, що більшість інгібіторів USP наразі перебувають на доклінічному етапі, деякі інгібітори USP1 вже пройшли ранні фази клінічної оцінки. Отримані дані перших фаз дослідження підтверджують сприятливий профіль безпеки, належну переносимість та виражену протипроліферативну активність цих молекул. Сукупність отриманих результатів окреслює їхній потенціал як нового класу молекулярно-мішеневих агентів, здатних розширити терапевтичний арсенал при хронічній мієлоїдній лейкемії, зокрема в контексті подолання резистентності до інгібіторів тирозинкінази та контролю мінімального залишкового захворювання [14, 27,36].

Висновки до розділу 1

Враховуючи структурно-функціональні особливості USP1 та його здатність регулювати рівень онкопротеїну Bcr-Abl, подальші дослідження спрямовані на створення рекомбінантних генетичних конструкцій pECFP-C3-USP1-domain-1 та pECFP-C3-USP1-domain-2 і їх експресію у клітинах лінії K562. Такий підхід дає змогу детальніше вивчити молекулярні механізми взаємодії USP1 з Bcr-Abl та визначити потенційні точки терапевтичного втручання. Аналіз доменної організації USP1 має принципове значення для з'ясування його локалізації, каталітичної активності та механізмів формування білкового комплексу Bcr-Abl/USP1, який на сьогодні залишається недостатньо дослідженим. Існують підстави вважати, що утворення цього комплексу сприяє деубіквітуванню Bcr-Abl, зниженню його протеосомної деградації, що, у свою чергу, призводить до накопичення онкопротеїну та прогресування захворювання.

Таким чином, поглиблене дослідження колокалізації Bcr-Abl та USP1 відкриває нові можливості для регуляції рівня онкопротеїну шляхом активації

протеосомної системи деградації та формує підґрунтя для розробки альтернативних терапевтичних стратегій у лікуванні хронічної мієлоїдної лейкемії.

РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Характеристика об'єкту і предмету дослідження

Об'єктом дослідження є білок USP1, зокрема його доменна організація.

Предметом дослідження є молекулярні механізми функціонування білка USP1 у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії людини.

Метою дослідження є створення генетичних конструкцій pECFP-C3-USP1-domain-1 і pECFP-C3-USP1-domain-2, вивчення особливостей локалізації доменів USP1 та їх колокалізації з онкопротеїном Bcr-Abl.

2.2 Основні та допоміжних матеріали

2.2.1. Реактиви

У роботі було використано наступні буферні системи та розчини: буфер Pfu+MgSO₄ (Thermo Scientific, США), тріс-ацетатний буфер (40 mM Tris, 20 mM CH₃COOH, 1 mM ЕДТА, pH 8,3), агарозний гель для проведення електрофорезу (1% агароза, 40 mM тріс-ацетатний буфер, дистильована вода), бромистий етидій (1 мкг/мл), буфер для адсорбції фрагментів ДНК з агаризованого гелю (5,0 M CH₆ N₄ S, 50 mM CH₃ COOK, 20 mM EDTA (0,5 M розчину з pH – 8.0), 0.5% Triton X-100), буфер для відмивки ДНК з фільтрів на колонках (100 mM Tris (pH 7.5), 500 mM EDTA (pH 8.0), 5000 mM NaCl, 96% етанол), однократний Orang-буфер (Thermo Fisher Scientific, США), двократний Tango-буфер (Thermo Fisher Scientific, США), лігазний буфер (Thermo Fisher Scientific, США), 0,1 M розчин хлориду кальцію (CaCl₂), неіонний детергент NID (5% сахароза, 30 mM ЕДТА (pH 8.0), Tris (pH 8.0), 0,75M NH₄Cl, 0.5% Triton X-100, лізоцим 100 мкг/мкл, РНКаза 25 мкг/мкл), 96% ізопропанол, 70% етанол, TurboFect (Thermo Fisher Scientific, США), буфер TBST (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20), фіксуючий буфер (4% формальдегід, 0,2% Triton X-100), буфер BSA (0,8 mM BSA, однократний TBST), буфер Mowiol.

Під час роботи з бактеріальною культурою використовували поживне

середовище LB Broth, Miller, (Amresco, США), агар (Sigma-Aldrich, США), 50 мг/мл канаміцин (Артеріум, Україна).

Для роботи з клітинною лінією K562 були використані: поживне середовище DMEM (Thermo Fisher Scientific, США) з додаванням 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби (Sigma, США), 50 од/мл пеніцилін (Артеріум, Україна), 100 мкг/мл стрептоміцин (Артеріум, Україна).

2.2.2 Підготовка буферних розчинів та поживних середовищ

Трис-ацетатний буфер (pH 8,3) на 100 м:

- 40 mM Tris - 0.485 г
- 20 mM CH₃ COOH - 0.120 г
- 1 mM EDTA - 0.037 г
- Дистильована вода до 100 мл [41].

Адсорбційний буфер (на 50 мл):

- 5,0 M тіоціанат гуанідину (CH₆ N₄ S) – 29, 54 г;
- 50 MM розчину ацетат калію (CH₃ COOK) – 0,83 мл;
- 20 mM EDTA(0,5 M розчину з pH – 8.0) – 2 мл;
- 0.5% Triton X-100 – 2,5 мл [42].

Буфер для відмивки ДНК з фільтрів на колонках на 50 мл:

- 100 mM Tris (pH 7.5) -2,5 мл;
- 500 mM EDTA (pH 8.0) - 1 мл;
- 5000 mM NaCl – 2 мл;
- 96% етанол - 26,04 мл [43].

Лізисний буфер з неіонним детергентом (NID) для виділення плазмідної ДНК на 50 мл:

- 5% сахароза – 2,5 г
- 50 mM Tris (pH 8.0) – 2,5 мл

- 30 мМ EDTA (рН 8.0) – 3 мл
- 0,75 М NH₄ Cl – 2 г
- 0,5% Triton X-100 – 2,5 мл
- лізоцим (100 мкг/мл) – 5 мг
- РНКаза А (25 мкг/мл) – 1,25 мг

Перед використанням буфер охолоджували та додавали ферменти безпосередньо перед лізисом клітин [44].

Буфер TBST (на 500 мл):

- 50 мМ Tris-HCl (рН 7.5) – 1М 25 мл;
- 150 мМ NaCl – 5М 15 мл;
- 0,05 % Tween-20– 250 мкл;
- Доводимо дистильованою водою до 500 мл.

Буфер TBST (Tris-Buffered Saline with Tween-20) готували у відповідності до стандартного складу: 50 мМ Tris-HCl (рН 7.5), 150 мМ NaCl, 0.05 % Tween-20. Для приготування 500 мл розчину до мірного циліндра додавали 25 мл 1 М Tris-HCl (рН 7.5), 15 мл 5 М NaCl, 250 мкл Tween-20 та доводили об'єм дистильованою водою до 500 мл. Після перемішування вимірювали рН розчину та за необхідності коригували до 7.5. Буфер зберігали при кімнатній температурі або при +4 °С до використання [45].

Фіксуєчий буфер для клітин лінії K562

- 0,2% Triton X-100 – 5 мкл;
- 4% Формальдегід – 2 мл [46].

Буфер BSA

- TBST (50 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 0,05 % Tween-20, рН 7.5) – 1,5 мл
- 0,08 мМ BSA – 0,08 г.

Буфер BSA застосовували як блокуючий розчин для запобігання неспецифічному зв'язуванню білків. Для його приготування 0,08 г бичачого

сироваткового альбуміну (BSA; молекулярна маса ≈ 66 кДа) розчиняли у 1,5 мл TBST-буфера (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 7.5). Розчин перемішували на вортексі до отримання однорідної суспензії. Кінцева концентрація білка становила 53,3 мг/мл (приблизно 0,8 mM за молекулярною масою білка). Буфер зберігали при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ не більше 24 годин [47].

Приготування монтажного середовища Mowiol для заключення клітин

Для заключення клітин після проведення флуоресцентного фарбування застосовували монтажне середовище Mowiol, яке забезпечує стабільну фіксацію препаратів між предметним та покривним склом, запобігає висиханню зразків і сприяє збереженню інтенсивності флуоресцентного сигналу під час мікроскопії.

Mowiol (полівініловий спирт) у поєднанні з гліцерином і Tris-буфером формує водорозчинне, помірно в'язке середовище, яке ефективно стабілізує флуоресценцію та забезпечує тривале збереження структури клітин. Для підвищення фотостабільності та продовження терміну збереження сигналу до складу середовища можна додати антифад-агенти, зокрема 1,4-діазабіцикло[2.2.2]октан (DABCO), або консервант натрій азид (NaN_3).

Компоненти середовища:

- Гліцерол – 6 г;
- Mowiol – 2.4 г;
- Дистильована вода – 6 мл;
- 0,2 M Tris-HCl буфера (pH 8,5) – 12 мл.

Приготування розчину здійснювали за модифікованим протоколом, адаптованим до умов лабораторії. У пластикову центрифужну пробірку об'ємом 50 мл вносили 6,0 г гліцерину та 2,4 г полімеру Mowiol 4-88, після чого суміш перемішували на магнітній мішалці до утворення однорідної суспензії. До отриманої суміші додавали 6,0 мл дистильованої води і залишали для набухання полімеру при температурі $18-22^{\circ}\text{C}$ протягом 2 годин.

Після інкубації додавали 12 мл 0,2 M Tris-HCl буфера (pH 8,5), що забезпечувало кінцевий об'єм розчину близько 24 мл. Пробірку інкубували на

водяній бані при 50°C з періодичним перемішуванням до часткового розчинення полімеру. Процес розчинення повторювали декілька разів до утворення прозорого, однорідного розчину. Тривалість етапу становила від 1 до кількох годин залежно від швидкості гідратації полімеру.

До охолодженого розчину вносили антифад-агент DABCO до кінцевої концентрації 2,5 % і перемішували на вортекс-мішалці до повного розчинення. Для усунення нерозчинених частинок зразок центрифугували при 5000 g протягом 15 хв. Отриманий прозорий супернатант обережно відбирали та розподіляли в аліквоти по 1,5 мл, які зберігали при температурі -20°C.

Показник заломлення готового середовища становить у середньому $1,40 \pm 0,02$. Для контролю стабільності кожену нову партію необхідно перевіряти рефрактометрично, порівнюючи з показниками свіжоприготовленого розчину. Встановлено, що показник заломлення Mowiol може незначно варіювати між партіями та поступово зростати в процесі затвердіння, що слід враховувати під час підготовки препаратів до флуоресцентної мікроскопії [48, 49].

Рідке поживне середовище LB (на 100 мл):

- Триптон – 1 г;
- Натрій хлористий (NaCl) – 1 г;
- Дріжджовий екстракт – 0,5 г ;
- Довести дистильованою водою до 100 мл.

Рідке поживне середовище LB (Luria–Bertani) готували шляхом розчинення 1,0 г триптон, 1,0 г NaCl та 0,5 г дріжджового екстракту у 100 мл дистильованої води з подальшим коригуванням pH до 7,0–7,2. Після повного розчинення компонентів середовище розливали у скляні флакони, закривали термостійкими кришками та піддавали стерилізації в автоклаві за стандартних умов автоклавування: 121°C, 1 атм надлишкового тиску (≈ 15 psi), 15–20 хвилин.

Після автоклавування флакони охолоджували до кімнатної температури. У разі необхідності додавання термолабільних компонентів (наприклад, антибіотиків) їх вносили до середовища після охолодження до 45–50°C [50].

Агаризоване поживне середовище LB (на 100 мл):

- Агар – 2.5 г
- Триптон – 1 г
- Натрій хлористий (NaCl) – 1 г
- Дріжджовий екстракт – 0,5 г
- Довести дистильованою водою до 100 мл.

Після розчинення компонентів середовища здійснили автоклавування за стандартних умов [50].

Агарозний гель для електрофорезу

- 40 мМ трис-ацетатний буфер (40 мМ Tris, 20 мМ CH_3COOH , 1 мМ EDTA, pH 8,3) – 600 мкл
- Агароза – 0,30 г
- Дистильована вода – 35 мл

Агарозний гель готували шляхом розчинення 0,30 г агарози в 35 мл дистильованої води з 1X трис-ацетатним буфером (ТАЕ-буфер) (40 мМ Tris, 20 мМ CH_3COOH , 1 мМ EDTA). Суміш нагрівали до повного розчинення агарози, охолоджували до $\sim 55^\circ\text{C}$ і заливали у форму з гребінкою. Після полімеризації гель переносили в електрофорезну ванну, заповнювали 1X ТАЕ-буфером і проводили електрофорез при 5 В/см. Після електрофорезу гель фарбували етидій-бромідом (1 мкг/мл) протягом 20 хв і промивали дистильованою водою перед візуалізацією [51].

2.2.3 Використані у роботі ферменти та антитіла

Pfu-DNA полімераза (Fermentas, Литва), T4-DNA лігаза (Fermentas, Литва), ендонуклеази рестрикції: Sall (Thermo Fisher Scientific, США), BglI (Thermo Fisher Scientific, США), BamHI (Thermo Fisher Scientific, США), EcoR1 (Thermo Fisher Scientific, США), PstI (Thermo Fisher Scientific, США); лізоцим (Thermo Fisher Scientific, США), РНКаза А (Thermo Fisher Scientific, США).

Первинні антитіла: anti-Bcr-Abl (MA1-153, Thermo Fisher Scientific, США).

Вторинні антитіла: anti-mouse (AS003, ABclonal Technology, США).

2.2.4 Біологічний матеріал

Плазмідний вектор. pECFP-C3 (Clontech, США).

Маркер молекулярних мас. GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

Клітинна лінія Escherichia coli TOP10 (Agilent Technologies, США).

Клітинна лінія людини. У дослідженні була використана іморталізована лінія людських мієлоїдних клітин K562, отримана з колекції банку клітин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Е. Кавецького НАН України. Лінія K562 була виділена від пацієнта з хронічною мієлоїдною лейкемією у фазі бластного кризу. Для цих клітин типовими є наявність філадельфійської хромосоми (Ph⁺) та додаткової хромосомної перебудови t(15;17).

2.2.5 Обладнання

Культивування бактеріальних культур здійснювали у шейкер-інкубаторі ES-20 (Biosan, Латвія), що забезпечував підтримання стабільних температурних умов та інтенсивності струшування. Роботу з клітинними культурами виконували в ламінарному боксі II класу біологічного захисту (ESCO, Німеччина), який гарантував стерильність умов та захист оператора.

Клітини лінії K562 підтримували у стандартних умовах культивування у CO₂ -інкубаторі (Binder, США) з контрольованими параметрами газового середовища. Осадження клітин *Escherichia coli* TOP10 та клітинної лінії K562, а також інші процедури молекулярно-генетичного аналізу проводили за допомогою мікроцентрифуги Epp 5415R (Eppendorf, Німеччина).

ПЛР проводили за допомогою ПЛР-ампліфікатора Eppendorf Master Cycler Personal (США). Електрофоретичне розділення нуклеїнових кислот виконували у горизонтальній електрофоретичній камері «Helicon» (Росія). Морфологічні характеристики клітин визначали з використанням інвертованого мікроскопа XD-50T (ULAB, Велика Британія), обладнаного системою фазово-контрастної

візуалізації. Імунофлуоресцентні дослідження проводили на лазерному конфокальному мікроскопі Zeiss LSM510 (Німеччина), що забезпечує високий рівень просторової роздільної здатності.

Усі маніпуляції з біомолекулами здійснювали з використанням піпет-дозаторів (Eppendorf, Німеччина). У роботі застосовували сертифікований лабораторний посуд із пластику та скла, придатний для роботи в умовах біологічної лабораторії.

2.3 Створення рекомбінантних генетичних конструкцій рECFP-C3-USP1-domain-1 та рECFP-C3-USP1-domain-2 та їх експресія в клітинах K562

2.3.1 Створення рекомбінантних генетичних конструкцій рECFP-C3-USP1-domain-1 та рECFP-C3-USP1-domain-2

Дослідження доменної організації білка USP1 є актуальним завданням, оскільки воно дозволяє з'ясувати його роль у каталітичній активності та механізмах формування комплексу Bcr-Abl/USP1, що безпосередньо впливає на стабільність онкопротеїну та прогресування хронічної мієлоїдної лейкемії. З метою вивчення внеску окремих доменів USP1 у взаємодію з Bcr-Abl та їх сумісну колокалізацію у клітині в рамках експерименту були створені рекомбінантні генетичні конструкції рECFP-C3-USP1-domain-1 та рECFP-C3-USP1-domain-2, які надалі експресувалися у клітинах лейкемічної лінії K562. Для цього були проведені наступні етапи роботи.

Ампліфікація цільових послідовностей доменів гена USP1. Для ампліфікації кодуючих послідовностей доменів гена USP1 були підібрані праймери, послідовності яких вказані в табл. 2.1. Підбір праймерів здійснювали за допомогою програми Serial Cloner 2.6.1.

Таблиця 2.1

**Праймери використані для ампліфікації цільових послідовностей гена
USP1**

Цільові послідовності гена <i>USP1</i>	Праймери:
USP1- domain-1:	Fwd – GACGAGCTGTACAAGTACTCAG
	Rev – attagtcgacATGACTGGTGTTCCTTGGATAAT
USP1- domain-2:	Fwd – gagtcgaccGAAGTTAAACCCATAAAACAAAGGTG
	Rev – TCAGTTATCTAGATCCGGTGGA

Матрицею для підбору праймерів та ПЛР слугувала генетична конструкція рЕСFP-C3-USP1, що містить кДНК цільових послідовностей. ПЛР проводили за допомогою ПЛР-ампліфікатора Eppendorf Master Cycler Personal (США). Компоненти ПЛР відповідали умовам виробника (Thermo Scientific) з використанням високоточної Pfu-полімерази. ПЛР проводили за наступних умов: початкову денатурацію ДНК – 5 хв при 95°C. Денатурація ДНК – 30 с при 95°C. Відпал праймерів – 30 с при 60°C. Елонгація тривала 1 хв при 72°C. Для напрацювання ДНК в необхідній кількості стадії 2-4 повторювали 29 разів. Кінцева елонгація проводилась 5 хв при 72°C. Успішність ампліфікації оцінювали за допомогою електрофорезу в агарозному гелі [52, 53].

Електрофоретичне розділення нуклеїнових кислот. Електрофорез проводили у 1% агарозному гелі у 40 мМ трис-ацетатному буфері (40 мМ Tris, 20 мМ CH₃ COOH, 1 мМ EDTA, рН 8,3) при напрузі 5 В/см. Для визначення розмірів ДНК використовували маркер GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, США). Візуалізацію фрагментів здійснювали шляхом обробки гелю бромистим етидієм (1 мкг/мл) та спостереженням на транслюмінаторі при довжині хвилі 254 нм.

Виділення ампліфікованих фрагментів ДНК із агарозного геля. Виконали

електрофоретичне розділення нуклеїнових кислот в агарозному гелі, визначили розміри і розташування фрагментів ДНК та вирізали з гелю смужку, яка несе цільовий фрагмент.

Гель з фрагментом ДНК зважили та додали трикратний об'єм (3X) адсорбційного буфера (5,0 М тіоціанат гуанідину ($\text{CH}_6 \text{N}_4 \text{S}$, 29,54 г), 1 М ацетат калію (1 М розчину $\text{CH}_3 \text{COOK}$, 0,83 мл), 20 мМ EDTA (0,5 М розчину 2,0 мл, pH 8.0), 5% Triton X-100 (2,5 мл). Суміш інкубували 10 хв при 50°C.

Отриману суспензію вносили у попередньо підготовлені пробірки для очищення ДНК. Для цього використовували 0,5 мл пробірки типу Епендорф із проколом дном, вставлені в 1,5 мл пробірки зі зрізаними кришками. На дно вставленої пробірки поміщали скловолоконний фільтр Whatman GF/C з діаметром пор 1,2 μm [54].

Отриману суспензію переносили до підготовлених пробірок та центрифугували при 8 000 g 2 хв. Для забезпечення повного зв'язування ДНК із фільтром процедуру повторювали до повного пропускання об'єму суспензії через колонку. Колонки двічі промили 300 мкл буферу для відмивки (1М Tris (pH 7.5) - 2,5 мл, 0,5 М EDTA (pH 8.0) - 1 мл, 5М NaCl - 2мл, 96% етанол - 26,04 мл), центрифугуючи після кожного промивання при 8 000 g протягом 2 хв. Додатково проводили промивання 300 мкл 96% етанолу з подальшим центрифугуванням при 8 000 g протягом 2 хв для видалення залишків солей. Після цього колонки висушували при кімнатній температурі до повного випаровування залишків етанолу.

Для елюції ДНК колонки переносили у чисті 1,5 мл пробірки, додавали 25 мкл дистильованої води та центрифугували при 5 000 g протягом 2 хв. Отриману елюцію збирали, за потреби додатково промивали та розчиняли осад у відповідному об'ємі дистильованої води. Концентрацію очищеної ДНК визначали спектрофотометрично.

Отримання генетичних конструкцій. Створення генетичних конструкцій для експресії цільових послідовностей та рестрикційний аналіз були змодельовані програмою Serial Cloner 2.6.1. Для клонування кодуючих послідовностей доменів

USP1 був використаний вектор pECFP-C3 (Clontech, США), який у кількості 5 мкг обробляли однією одиницею по 0,3 мкл (3 U) відповідних рестриктаз. Ампліфіковану кодуючу послідовність USP1-domain-1 інкубували з ендонуклеазами BamHI та SalI. Після цього вставку USP1-domain-1 лігували у вектор pECFP-C3, який попередньо був порізаний за сайтами рестрикції SalI та BglI. Для створення генетичної конструкції pECFP-C3-USP1-domain-2 вектор pECFP-C3 обробили ендонуклеазами рестрикції BamHI та SalI. Ампліфіковану кодуючу послідовність USP1-domain-2 інкубували з ендонуклеазами BamHI та SalI. За допомогою інструменту Double Digest Calculator визначили оптимальні умови проведення реакції рестрикції та підібрали буферні розчини. Для рестриктаз SalI та BglI використовувався стандартний однократний Orang-буфе, для BamHI та SalI – двократний Tango-буфер (Thermo Fisher Scientific). Рестрикційна суміш інкубувалась впродовж години при 37°C з подальшою термоінактивацією при 80°C протягом 20 хвилин. Для проведення лігування було взято молекулярне співвідношення вектора до вставки 1:3. До складу реакційної суміші було внесено: 200 ng плазмідної ДНК, 600 ng USP1-domain-1 та USP1-domain-2 відповідно, 5 U T4-ДНК-лігази (Thermo Fisher Scientific, США), 0,5 мМ АТФ, однократний (1X) лігазний буфер. Реакцію проводили впродовж 24 годин при 20°C з наступною 20-хвилинною інактивацією при 75°C, додаванням ферменту-кілера EcoRI до суміші, де це необхідно, інкубацією 30 хвилин при 37°C з наступною 20-хвилинною інактивацією при 65°C. Для проведення контролю була проведена та сама реакція лігування, але без вставки доменів у вектор [52, 53].

Отримання компетентних клітин. Для підготовки компетентних клітин використовували штам *Escherichia coli* TOP10 (Agilent Technologies, США). Початково 500 мкл нічної культури клітин інокулювали у 50 мл поживного середовища LB (1% NaCl, 1% триптон, 0,5% дріжджовий екстракт) (Amresco, США), у співвідношенні 1:100 та культивували на термошейкері при 37 °C і 140 rpm до досягнення оптичної густини OD600 $\approx$ 0,3, що відповідає логарифмічній фазі росту клітин.

Після цього культура була охолоджена на льоду для зупинки росту та підготовки до обробки. Для отримання компетентності 1 мл культури відбирали в пробірки об'ємом 1,5 мл та центрифугували при 4 °C, 8 000 g протягом 5 хв. Супернатант обережно видаляли, а осад клітин ресуспендували в 1 мл охолодженого 0,1 М розчину хлориду кальцію (CaCl_2) та інкубували на льоду протягом 30 хв. Після повторного центрифугування при 4 °C, 8 000 g протягом 5 хв супернатант знову видаляли, а клітини ресуспендували у 500 мкл 0,1 М CaCl_2 .

Компетентні клітини розфасували у мікропробірки, що містили кріопротектор (гліцерин), та зберігали при -80 °C до використання. Всі операції виконували при низьких температурах (на льоду), щоб зберегти життєздатність клітин і високу трансформаційну здатність [55, 56].

Трансформація. Лігазну суміші об'ємом не більше 5% від загального об'єму аліквоти вносили до компетентних клітин, які попередньо тримали на льодові 10 хв. Отриману суспензію ретельно перемішували та інкубували на льодові протягом 30 хв. Тепловий шок проводили на водяній бані з температурою +42°C протягом 90 с і переносили пробірки на лід на 2 хв. До реакційної суміші додавали поживне середовище LB (1% NaCl; 1% триптон; 0,5% дріжджовий екстракт) без антибіотика та інкубували протягом 40 хв у термостаті за температури +37°C при постійному перемішуванні 120 об/хв. Культуру відбирали шляхом центрифугування за умови 8 000-10 000 g протягом 2 хв та висівали її на стерильні чашки Петрі з твердим поживним середовищем LB з агаром та 12,5 мкм канаміцину за допомогою бактеріального шпателя. Чашки Петрі з культурою інкубували у термостаті протягом 10-12 год за температури +37°C після чого аналізували колонії, що вирости.

Отримані колонії висівали в рідке середовище LB з 100 мкг/мл канаміцину та нарощували протягом 18 годин. Плазмід з рідкого середовища виділяли методом лізису неіонними детергентами [52, 53].

Виділення плазмід методом лізису неіонними детергентами (NID). Культуру клітин центрифугували протягом при 7 000 g протягом 1 хв. Надосад видаляли, а до осаду, який становили бактеріальні клітини додавали неіонний

детергент (NID) (5% сахарози, 30 мМ ЕДТА, 50 мМ Tris (pH 8.0), 0,75 М NH₄Cl, 0,5% Triton X-100, 100 мкг/мл лізоцим та 25 мкг/мл РНКаза А), ретельно перемішували за допомогою вортекс та залишали на 5 хв на водяній бані з температурою +65°C. Отриману суспензію процентрифугували 40 хв при 13 000 g до утворення щільного бактеріального осаду. Видалили бактеріальний осад. До супернатанту додали 600 мкл ізопропанолу та процентрифугували 20 хв при 13 000 g при кімнатній температурі. Супернатант видаляли та промивали за допомогою 1 мл 70% етанолу впродовж 5 хв при 13 000 g. Після видалення етанолу осад сушили при кімнатній температурі та розчиняли в потрібному об'ємі дистильованої води [44, 52, 53].

Рестрикційний аналіз генетичних конструкцій *pECFP-C3-USP1-domain-1* та *pECFP-C3-USP1-domain-2*. Перевірку на наявність вставки у векторі було виконано методом аналітичного розрізання ендонуклеазами рестрикції за умовами виробника. Аналіз *pECFP-C3-USP1-domain-1* здійснили за допомогою ендонуклеаз рестрикції SalI та PstI. Генетичну конструкцію *pECFP-C3-USP1-domain-2* вивчали за допомогою – EcoRI.

За результатами ПЛР реакції були отримані цільові послідовності двох доменів гена USP1, з очікуваними для них розмірами. За допомогою реакції лігування було створено генетичні конструкції *pECFP-C3-USP1-domain-1* та *pECFP-C3-USP1-domain-2*.

Генетичні конструкції *pECFP-C3-USP1-domain-1* та *pECFP-C3-USP1-domain-2* були успішно ідентифіковані шляхом картування за відповідними сайтами рестрикції. Так, після розрізання виділених плазмід *pECFP-C3-USP1-domain-1* та *pECFP-C3-USP1-domain-2*, які, містили вставки цільових генів, було виявлено відповідні фрагменти різних розмірів методом електрофоретичного розділення нуклеїнових кислот за стандартних умов. Правильність рамки зчитування підтверджено шляхом секвенування.

Враховуючи наведені дані, наступним етапом експериментальної роботи була трансфекція клітинної лінії K562 отриманими рекомбінантними конструкціями USP1-domain-1 та USP1-domain-2 з метою дослідження механізмів

колокалізації білка USP1 з онкопротейном Bcr-Abl та оцінки внеску кожного домена у формування білкового комплексу [52, 53].

2.3.2 Трансфекція клітинної лінії K562 плазмідною ДНК pECFP-C3-USP1- domain-1 та pECFP-C3-USP1- domain-2

Умови культивування. Клітини K562 культивували у середовищі DMEM (Thermo Fisher Scientific, США) з додаванням 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби (Sigma, США), пеніциліном (50 од/мл) та стрептоміцином (100 мкг/мл). Інкубацію клітин здійснювали у зволоженій атмосфері з вмістом 5% CO₂ при температурі +37°C. При досягненні клітинами ступеню покриття поверхні культурального посуду на 70-80% проводили пересівання у співвідношенні 1:10. Для цього клітини відбирали у стерильні пробірки типу епандорф та центрифугували протягом 1–2 хв при 1 000 g. Після видалення надосадової рідини клітини ресуспендували у свіжому середовищі DMEM, що містило всі необхідні компоненти для росту та переносили у новий стерильний культуральний посуд.

Трансфекція pECFP-C3-USP1-domain-1 та pECFP-C3-USP1-domain-2 у клітини K562. Трансфекцію було виконано з використанням TurboFect (Thermo Fisher Scientific, США). Для трансфекції використали 5 мкл pECFP-C3-USP1-domain-1 та 8 мкл pECFP-C3-USP1-domain-2. Плазмідну ДНК розчиняли у 100 мкл середовища DMEM без сироватки, після чого вносили по 10 мкл TurboFect. Отриману суміш ретельно перемішували за допомогою вортекса та інкубували при кімнатній температурі протягом 20 хв. Після чого трансфекційну суміш вносили до клітин K562 з 80% конфлюентності та культивували у середовищі DMEM з додаванням 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби, пеніциліну (50 од/мл), стрептоміцину (0,25 мкл/мл) протягом 24 год при +37°C та 5% CO₂.

Імунофлуоресцентний аналіз. Клітини K562 центрифугували при 2 000 g протягом 2 хв, після чого надосадову рідину видаляли. Осаджені клітини двічі промивали 70 мкл буферу TBST (50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0,05% Твен

20), виконуючи центрифугування при 2 000 g впродовж 2 хв на кожному етапі відмивки. Клітинний осад ресуспендували у 200 мкл фіксуєчого буферу за допомогою 4% формальдегіду з 0,2% буфера Triton X-100. Фіксацію проводили протягом 20 хв. Далі клітини знову центрифугували (2 000 g, 2 хв) та двічі промивали у 70 мкл буфера TBST. Отриманий осад ресуспендували у 50 мкл буфера BSA та інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі. Після центрифугування при 2 000 g, 2 хв клітини інкубували з первинними антитілами anti-Bcr-Abl (MA1-153, Thermo Fisher Scientific, США) у розведенні 1:100 (0,5 мкл антитіл у 50 мкл BSA) протягом 1 год при кімнатній температурі. Осаджені клітини двічі промивали 70 мкл буферу TBST, після чого інкубували з вторинними антитілами anti-mouse (AS003, ABclonal Technology, США), у співвідношенні 0,3 мкл антитіл у 25 мкл буфера TBST протягом 1 год без доступу світла з періодичним струшуванням.

Подальше центрифугування проводили при 3 000 g протягом 2 хв, після чого клітини промивали у 50 мкл буфера TBST. Для заключення клітин після проведення флуоресцентного фарбування клітини ресуспендували у 10 мкл буфера Mowiol, яке забезпечило стабільну фіксацію препаратів між предметним та покривним склом, а також посприяло збереженню інтенсивності флуоресцентного сигналу під час мікроскопії.

Конфокальна мікроскопія. Підготовлені зразки аналізували за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопу Zeiss LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Німеччина), обладнаного масляним об'єктивом 100×/1,25 N.A., з використанням програмного забезпечення LSM Browser.

Оцінка колокалізації. Кількісна оцінка колокалізації доменів білка USP1 з онкопротейном Bcr-Abl у клітинах лінії K562 проводилася з використанням стандартних алгоритмічних підходів та спеціалізованого програмного забезпечення для аналізу флуоресцентних мікроскопічних зображень, а саме ImageJ та мови програмування R. Для кількісної оцінки колокалізації були використані статистичні коефіцієнти Пірсона та Мандерса. Застосування саме цих коефіцієнтів дозволило поєднати оцінку лінійної кореляції сигналів із

визначенням частки перекриття флуоресцентних міток у кожному каналі, що є інформативним при дослідженні білкових взаємодій та субклітинної організації.

Коефіцієнт Пірсона (Pearson's correlation coefficient (PCC)) визначає лінійну кореляцію інтенсивності пікселів між двома каналами зображення. Він розраховується за формулою 2.1:

$$r = \frac{\sum_i (R_i - \bar{R})(G_i - \bar{G})}{\sqrt{\sum_i (R_i - \bar{R})^2 \sum_i (G_i - \bar{G})^2}} \quad (2.1)$$

де R_i та G_i - інтенсивності відповідно червоного та зеленого каналів у пікселі i , а $\bar{R}$ і $\bar{G}$ — середні значення інтенсивності каналів по всьому зображенню.

Значення коефіцієнта Пірсона варіює від -1 до +1 і відображає ступінь лінійної кореляції між сигналами двох каналів. Значення +1 свідчить про повну позитивну кореляцію, коли пікселі обох каналів збігаються у локалізації; значення 0 означає відсутність кореляції, тобто сигнал одного каналу не пов'язаний із сигналом іншого; значення -1 вказує на повну негативну кореляцію, що відповідає i сигналів незалежно від їх абсолютної інтенсивності. PCC є незалежним від абсолютної інтенсивності сигналу, що робить його корисним для порівняння зображень із різною експресією білка або різною інтенсивністю міток [57].

Коефіцієнти Мандерса доповнюють оцінку коефіцієнта Пірсона, визначаючи фракцію сигналу одного білка, яка перекривається із сигналом іншого білка. M1 відображає відсоток пікселів першого каналу, що колокалізуються з другим каналом, тоді як M2 характеризує аналогічну фракцію для другого каналу відносно першого. Ці коефіцієнти обчислюються за формулами 2.2 та 2.3:

$$M1 = \frac{\sum_i R_{i,coloc}}{\sum_i R_i}, \quad (2.2)$$

$$M2 = \frac{\sum_i G_{i,coloc}}{\sum_i G_i} \quad (2.3)$$

де $R_{i,coloc}$ і $G_{i,coloc}$ - інтенсивності пікселів, які співпадають у двох каналах (тобто перевищують порогове значення), а R_i і G_i - загальні інтенсивності пікселів у відповідних каналах.

Значення $M1$ та $M2$ лежать у межах від 0 до 1 і дозволяють оцінити часткове перекриття сигналів, виявити асиметричну колокалізацію та визначити її напрямки. На відміну від PCC , коефіцієнти Мандерса залежать від порогового відсікання сигналу, що дозволяє ефективно відокремити реально колокалізовані пікселі від фонових шумів [57].

Комбіноване використання коефіцієнтів Пірсона та Мандерса дозволяє отримати як загальну оцінку кореляції сигналів (PCC), так і кількісну характеристику перекриття сигналів по обох каналах ($M1$ та $M2$), що є особливо важливим при дослідженні білкових взаємодій у клітині [58, 59, 60].

Програмне забезпечення та загальні підходи до аналізу. Для аналізу отриманих конфокальних зображень використовували програмне середовище ImageJ/Fiji, що є універсальною платформою для обробки біологічних зображень із відкритим вихідним кодом. Fiji містить попередньо встановлені модулі, зокрема плагіни JACoP та Coloc 2, які широко застосовуються для кількісної оцінки колокалізації у двоканальних та багатоканальних флуоресцентних зображеннях. Розширюваність Fiji за рахунок великої кількості плагінів забезпечує можливість адаптації алгоритмів під конкретні експериментальні завдання, включаючи сегментацію, порогову фільтрацію, деконволюцію та статистичну обробку даних [58, 61].

Мова програмування R є потужним середовищем для статистичного аналізу, моделювання та опрацювання даних у біомедичних дослідженнях. Вона підтримує широкий спектр типів даних (вектори, матриці, таблиці, списки) та забезпечує можливість об'єктно-орієнтованого програмування, що робить її універсальним інструментом для роботи зі складними біологічними структурами. Завдяки великому набору спеціалізованих пакетів, доступних у репозиторіях CRAN та Bioconductor, R широко використовується для аналізу геномних, протеомних, клітинних та інших високопродуктивних даних. Інтеграція з такими ресурсами, як GenBank, Entrez Genes та UCSC Genome Browser, розширює можливості обробки біологічної інформації та сприяє використанню R у сучасній біоінформатиці. Додаткові інструменти, зокрема пакети dplyr і ggplot2,

забезпечують ефективну статистичну обробку та високоякісну візуалізацію експериментальних результатів, що є важливим елементом аналітичних досліджень [63,64, 65, 66].

Одним із перспективних напрямів використання R є кількісна оцінка колокалізації сигналів у конфокальній мікроскопії, що дозволяє об'єктивно визначати ступінь взаємодії між білковими структурами в клітинах. Для цього розроблено низку спеціалізованих пакетів, серед яких найбільш широко використовуваними є `coloc` та `ColocalizR`. Пакет `coloc` орієнтовано на аналіз двоканальних флуоресцентних зображень: він забезпечує виконання основних етапів - від імпорту та підготовки зображень до нормалізації інтенсивності сигналів і визначення порогових значень - та обчислює ключові показники колокалізації, включно з коефіцієнтом кореляції Пірсона та коефіцієнтами Мандерса. Важливою перевагою є наявність графічного інтерфейсу на базі Shiny, що робить пакет доступним для дослідників без поглибленого досвіду в аналізі зображень або програмуванні [66].

Пакет `ColocalizR` пропонує розширені можливості для високопродуктивного аналізу великих наборів мікроскопічних даних. Він підтримує автоматичну сегментацію клітин та субклітинних структур, визначення морфологічних та текстурних характеристик, а також паралельну обробку зображень, що значно підвищує продуктивність аналізу. Завдяки можливості оцінки колокалізації на рівні окремих клітин `ColocalizR` дає змогу досліджувати неоднорідність клітинних популяцій та виявляти субпопуляції з різним рівнем взаємодії білкових сигналів. Графічний інтерфейс та гнучкі функції експорту результатів забезпечують зручність інтеграції цього пакета у біоінформатичні робочі процеси [67].

Завдяки поєднанню статистичної потужності, відкритості, широкій підтримці наукової спільноти та наявності спеціалізованих інструментів для аналізу флуоресцентних зображень, програмне середовище R є одним із найбільш ефективних рішень для кількісного дослідження колокалізації білків у конфокальній мікроскопії [62,63, 64, 65].

Аналіз колокалізації у середовищі ImageJ/Fiji. Для визначення ступеня

колокалізації доменів USP1 з онкопротеїном Bcr-Abl був застосований плагін JACoP (Just Another Co-localization Plugin). Цей модуль реалізує алгоритми, що дозволяють автоматизовано обчислювати коефіцієнт кореляції Пірсона та коефіцієнти Мандерса, забезпечуючи об'єктивну та відтворювану оцінку просторової взаємозалежності сигналів. Алгоритм обробки зображень у ImageJ включав такі етапи:

1. Розділення каналів для незалежного аналізу флуоресцентних міток.
2. Порогову фільтрацію, що дозволяє відокремити специфічний сигнал від фонового шуму.
3. Розрахунок коефіцієнтів PCC, M1 та M2 за допомогою плагіну JACoP.
4. Статистичну обробку даних та експорт результатів у табличному форматі для подальшого аналізу.

Застосування цих етапів дозволило мінімізувати внесок фонових артефактів та підвищити точність кількісної оцінки колокалізації білкових сигналів [58, 61].

Аналіз колокалізації у середовищі R. Мова програмування R виступала додатковим інструментом для поглибленої статистичної інтерпретації результатів та обробки великих масивів даних. Програмне забезпечення допомогло здійснити автоматизоване виконання базових та розширених процедур аналізу, включаючи:

1. Імпорт багатоканальних конфокальних зображень (формати TIFF, LIF).
2. Попередню обробку зображень: нормалізацію інтенсивності, приглушення шуму, видалення артефактів та корекцію нерівномірного освітлення.
3. Розрахунок коефіцієнтів Пірсона та Мандерса для кожної пари каналів.
4. Візуалізацію результатів у вигляді діаграм boxplot.

Висновки до розділу 2

Отже, в цьому розділі кваліфікаційної роботи представлено повний комплекс матеріалів, реагентів, клітинних ліній і лабораторного обладнання, необхідних для виконання молекулярно-біологічних методів, а також стандартизовані протоколи приготування розчинів і середовищ. Таким чином, можна підвести підсумок, що сформована методична база забезпечує можливість конструювання

генетичних конструкцій, аналізу субклітинної локалізації доменів USP1 та оцінки їхньої колокалізації з онкопротеїном Vcr-Abl у клітинах K562, що відповідає поставленій меті роботи, гарантує відтворюваність та наукову коректність подальших експериментальних досліджень.

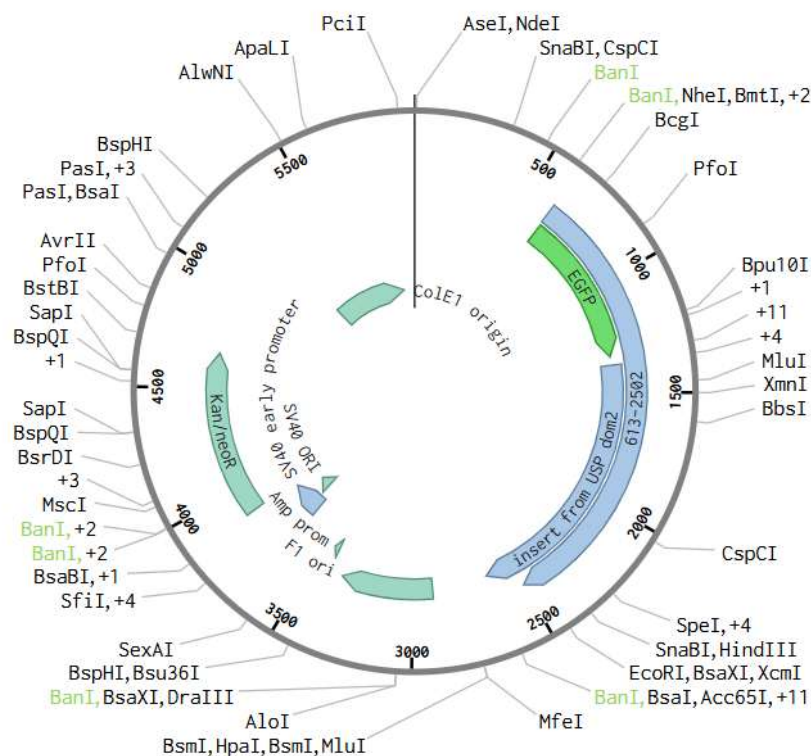


Рис. 3.2 Схема будови генетичної конструкції pECFP-C3-USP1-domain-2 [53].

Генетичні конструкції pECFP-C3-USP1-domain-1 та pECFP-C3-USP1-domain-2 були успішно ідентифіковані шляхом картування за відповідними сайтами рестрикції. Так, після розрізання виділених плазмід pECFP-C3-USP1-domain-1 та pECFP-C3-USP1-domain-2, які, містили вставки цільових генів, було виявлено фрагменти різних розмірів методом електрофоретичного розділення нуклеїнових кислот за стандартних умов. Для pECFP-C3-USP1-domain-1 ці фрагменти становили: 5 п.н., 215 п.н., 5381 п.н., а для pECFP-C3-USP1-domain-2 1081 п.н., 4897 п.н. (рис.3.3). Правильність рамки зчитування підтверджено шляхом секвенування [52, 53].

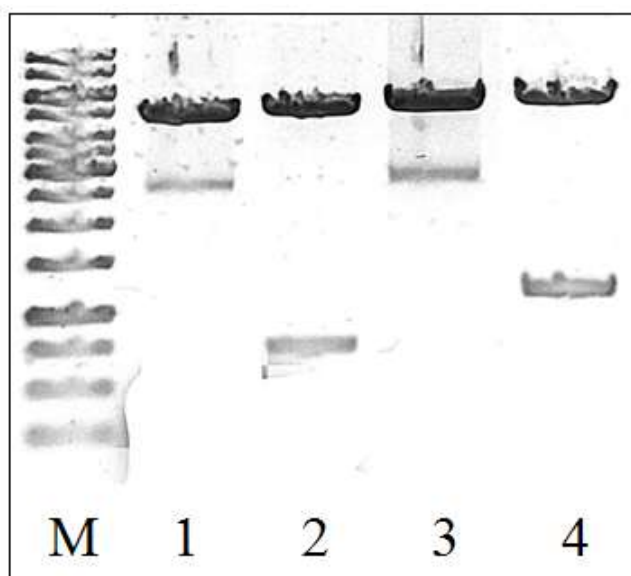


Рис. 3.3 Електрофореграма, скринінг цільових рекомбінантів: 1 – вектор рЕСFP-С3, результати рестрикційного картування за сайтами SalI, PstI; 2 – результати реакції лігування кодуючої послідовності домена 1 гена USP1 у плазмідний вектор рЕСFP-С3, результати рестрикційного картування рЕСFP-С3-USP1 за сайтами SalI, PstI; 3 - вектор рЕСFP-С3, результати рестрикційного картування за сайтами EcoRI; 4 – результати реакції лігування кодуючої послідовності домена 2 гена USP1 у плазмідний вектор рЕСFP-С3, результати рестрикційного картування рЕСFP-С3-USP1 за сайтами EcoRI. М – маркер молекулярних мас GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) [53].

3.2 Структурна будова білків USP1-domain-1 та USP1-domain-2

У попередньому підрозділі було описано створені генетичні конструкції рЕСFP-С3-USP1-domain-1 та рЕСFP-С3-USP1-domain-2, які слугували основою для експресії відповідних доменів білка USP1 у клітинній лінії K562. Трансфекція цих конструкцій забезпечила синтез цільових білків, що дозволило провести їх структурний та функціональний аналіз.

Генетична конструкція USP1-domain-1 кодує білок довжиною 294 амінокислотні залишки. Структурний аналіз домену (рис. 3.4) показав, що він включає два сайти ядерної локалізації (NLS), сигнал ядерного експорту (NES), вставку L1, деградуєчий мотив та ділянку взаємодії з UAF1 [52, 53].

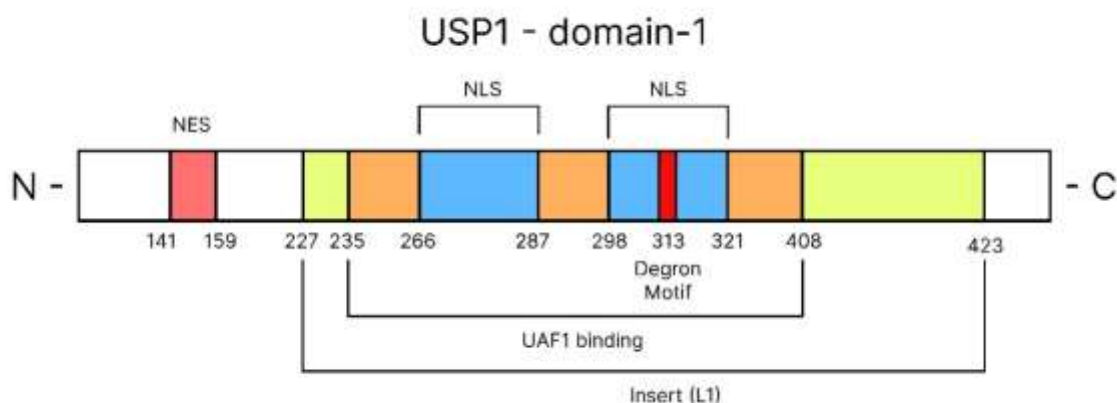


Рис. 3.4 Структурна будова домену білка USP1-domain-1. NES - сигнал ядерного експорту; NLS - сайти ядерної локалізації; Degron motif - деградуєчий мотив; UAF1 binding - ділянка, відповідальна за взаємодію з UAF1; Insert (L1)- вставка L1.

Сайти ядерної локалізації (NLS) забезпечують транспортування білка в ядро, тоді як сигнал ядерного експорту (NES) відповідає за його вихід у цитоплазму. Вставка L1 (L1 insert) є унікальною петлею в каталізаторно-подібному домені USP1 і бере участь у регуляції активності білка. Мотив деградації (Degradation Motif) визначає білок як субстрат для убіквітин-залежної деградації, а ділянка взаємодії з UAF1 (UAF1-interacting region) забезпечує зв'язування з регуляторним партнером, необхідним для активації USP1.

Таким чином, аналіз структурних елементів USP1-domain-1 свідчить, що домен містить ключові компоненти, які визначають його субклітинну локалізацію, стабільність та здатність до регуляторних взаємодій.

Структурна будова домену білка USP1-domain-2 (рис. 3.5) закодована 379 амінокислотами, містить два сайти His-боксу (H593 і D751), сайт автокаталітичного розщеплення G670/G671, вставку L2 та ділянку взаємодії з UAF1 [52, 53].

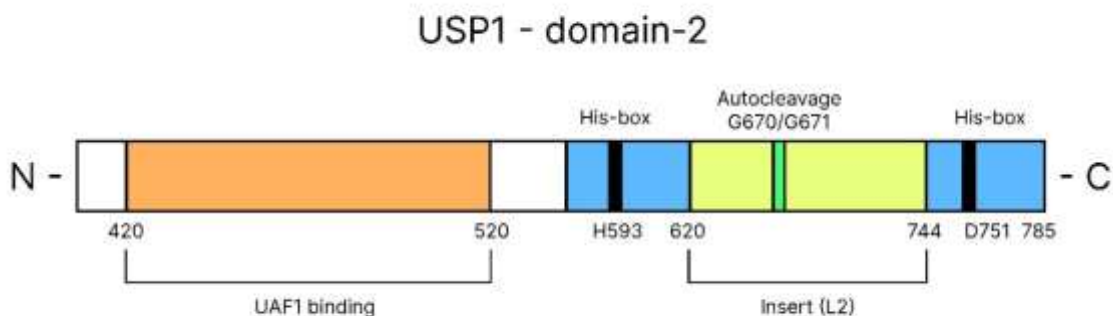


Рис. 3.5 Структурна будова домену білка USP1-domain-2. UAF1 binding - ділянка, відповідальна за взаємодію з UAF1; His-box (H593 і D751) - частина каталітичного центру His-боксу; Autocleavage G670/G671 - сайт автокаталітичного розщеплення; Insert (L2) - вставка L2.

Сайти His-боксу (H593 і D751) формують каталітичне ядро білка і забезпечують гідроліз убіквітину, що визначає ферментативну активність USP1. Сайт автокаталітичного розщеплення (G670/G671) необхідний для правильного процесингу та функціонування білка. Вставка L2 (L2 insert) є регуляторною петлею, що модулює ферментативну активність домену. Ділянка взаємодії з UAF1 (UAF1-interacting region) забезпечує формування активного білкового комплексу USP1-UAF1.

Отже, USP1-domain-2 включає ключові каталізаторно-функціональні елементи, які визначають його деубіквітиназну активність та здатність до взаємодії з регуляторними білковими партнерами, забезпечуючи виконання біологічних функцій білка.

3.3 Результати конфокальної мікроскопії

Після аналізу структурних характеристик доменів USP1 наступним етапом дослідження було визначення їх субклітинної локалізації. Для цього здійснено конфокальну мікроскопію клітин лінії K562, трансфікованих конструкціями USP1-domain-1 та USP1-domain-2. Отримані результати дозволяють візуалізувати розподіл білкових доменів у клітині та оцінити їх колокалізацію з

внутрішньоклітинними структурами (рис. 3.6 –3.8).

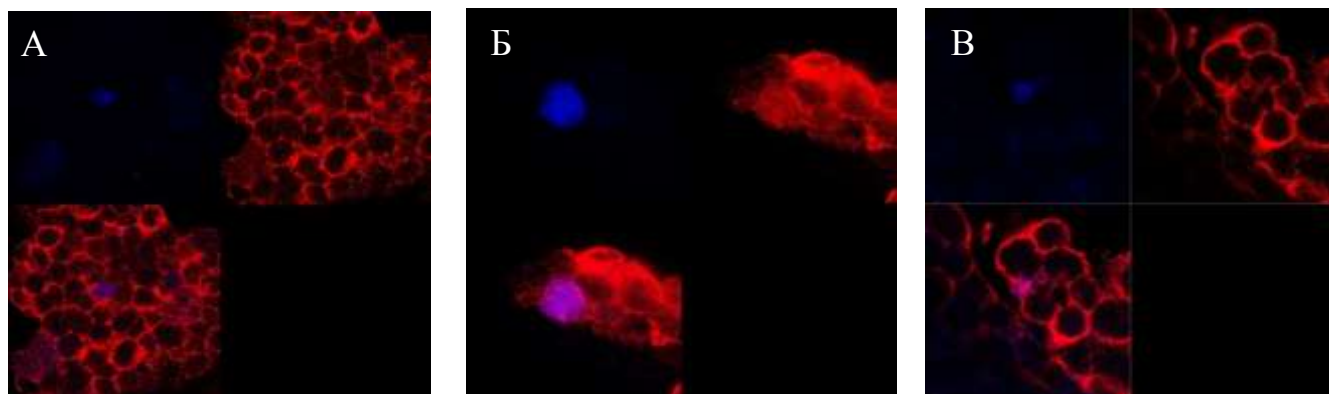


Рис. 3.6 Колокалізація USP1-domain-1 (синє) і Vcr-Abl (червоне) у клітинах K562. Імунофлуоресцентний аналіз з подальшою конфокальною мікроскопією. Збільшення x100.

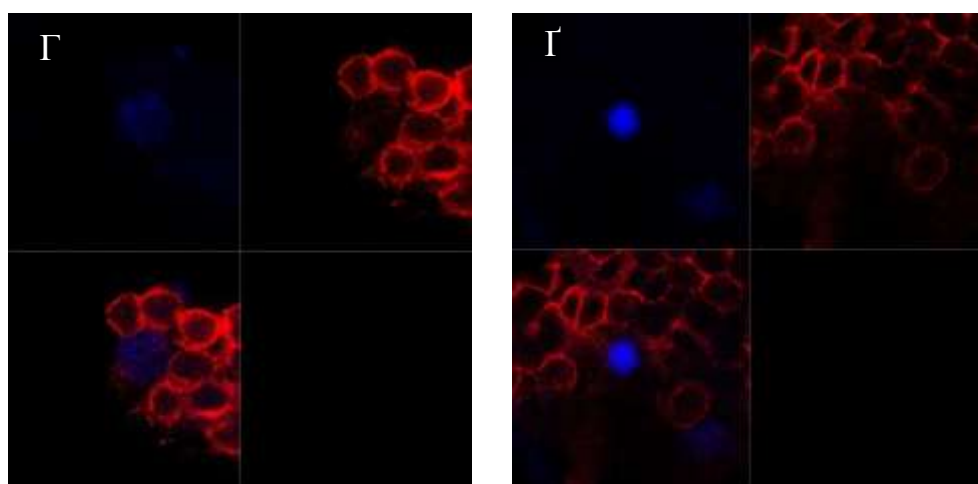


Рис. 3.7 Колокалізація USP1-domain-2 (синє) і Vcr-Abl (червоне) у клітинах K562. Імунофлуоресцентний аналіз з подальшою конфокальною мікроскопією. Збільшення x100

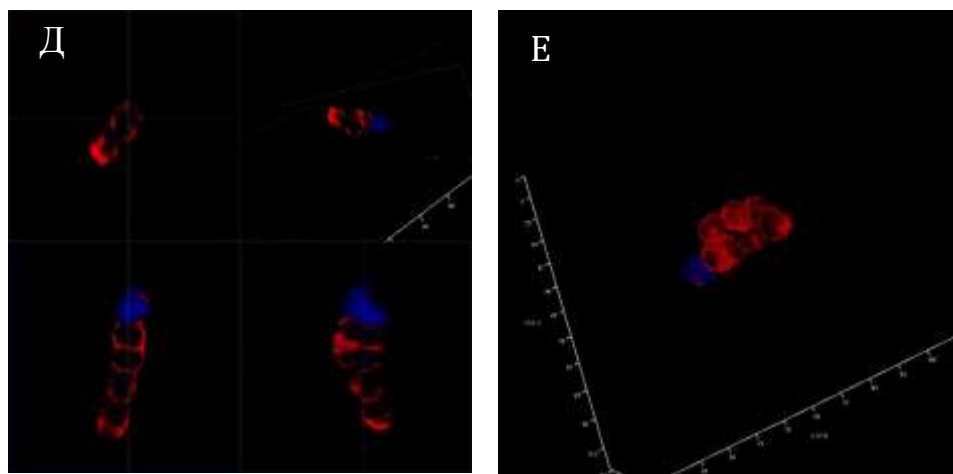


Рис. 3.8 Конфокальна мікроскопія клітин лінії K562 з експресією білка USP1.

Д, Е – 3D-структура клітин K562 в різних площинах

Отримані зображення слугують експериментальною основою для кількісного аналізу колокалізації досліджуваних доменів з онкопротеїном Bcr-Abl та підтвердження функціональної релевантності структурних особливостей білків.

3.4 Аналіз колокалізації доменів білка USP1 з онкопротеїном Bcr-Abl у клітинах лінії K562

Після визначення структурної будови доменів USP1 та оцінки їх субклітинної локалізації за допомогою конфокальної мікроскопії, наступним кроком дослідження було вивчення колокалізації між доменами білка USP1 і онкопротеїном Bcr-Abl у клітинах лінії K562. Для цього застосовувалося програмне забезпечення ImageJ та мова програмування R, що дозволяє обчислювати коефіцієнти Пірсона та Мандерса, показники кількісної колокалізації білкових сигналів. Результати аналізу наведені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Результати аналізу колокалізації доменів білка USP1 з онкопротейном Bcr-Abl у клітинах лінії K562 за допомогою програмного забезпечення ImageJ та мови програмування R (коефіцієнти Пірсона та Мандерса)

Зразок		Коефіцієнти				
		Pearson's Coefficient r	Manders' Coefficients (original) M1	Manders' Coefficients (original) M2	Manders' Coefficients (з використанням порогового значення для imgA та для imgB) M1	Manders' Coefficients (з використанням порогового значення для imgA та для imgB) M2
А	ImageJ	0.048	0.001	1.0	0.003	1.0
	R	0.048	0.001	1.0	0.001	1.0
Б	ImageJ	0.052	0.002	1.0	0.003	1.0
	R	0.052	0.002	1.0	0.002	1.0
В	ImageJ	0.063	0.003	1.0	0.005	1.0
	R	0.063	0.003	1.0	0.003	1.0
Г	ImageJ	0.077	0.004	1.0	0.007	1.0
	R	0.077	0.004	1.0	0.004	1.0
Ґ	ImageJ	0.093	0.003	1.0	0.008	1.0
	R	0.093	0.003	1.0	0.003	1.0
Д	ImageJ	0.187	0.049	0.379	0.075	0.379
	R	0.187	0.049	0.379	0.049	0.379
Е	ImageJ	0.751	0.364	1.0	0.449	1.0
	R	0.751	0.364	1.0	0.364	1.0

Аналіз отриманих значень дозволяє зробити наступні висновки:

- 1) USP1-domain-1 демонструє низькі показники коефіцієнтів Пірсона (0.048–0.063), що свідчить про слабкий кореляційний просторовий збіг із Bcr-Abl. Коефіцієнти Мандерса при пороговій обробці залишаються низькими, що вказує на обмежену специфічну колокалізацію. Це може свідчити про те, що USP1-domain-1 не є основним елементом, відповідальним за просторову колокалізацію з Bcr-Abl у клітині.
- 2) USP1-domain-2 проявляє значно вищу колокалізацію з Bcr-Abl у деяких зразках, що свідчить про виражену просторову колокалізацію. Високі

значення коефіцієнтів Мандерса підтверджують можливість формування активного комплексу USP1/Bcr-Abl, що може бути функціонально релевантним для регуляції деубіквітиназної активності та взаємодії з білковими партнерами.

- 3) Загалом, порівняння колокалізації двох доменів показує, що USP1-domain-2 відіграє більш значущу роль у просторовому співіснуванні з Bcr-Abl, тоді як USP1-domain-1, ймовірно, виконує інші регуляторні або структурні функції.

Таким чином, результати аналізу колокалізації підтверджують функціональну різницю між доменами USP1 у колокалізації з онкопротейном Bcr-Abl і слугують підґрунтям для подальшого дослідження механізмів формування активного білкового комплексу в клітинах K562.

3.5 Порівняльний BoxPlot-аналіз коефіцієнтів Пірсона та Мандерса для доменів USP1-domain-1 і USP1-domain-2

Для оцінки відмінностей у ступені колокалізації окремих доменів білка USP1 з онкопротейном Bcr-Abl було проведено порівняльний статистичний аналіз отриманих коефіцієнтів Пірсона та Мандерса. Використання BoxPlot-графіків дозволило візуалізувати розподіл значень для USP1-domain-1 та USP1-domain-2 та оцінити можливі відмінності між ними. Такий підхід забезпечує узагальнене представлення варіабельності даних і дає змогу виявити потенційні тенденції, що можуть мати функціональне значення у подальшій інтерпретації результатів аналізу колокалізації.

3.5.1 Порівняльний BoxPlot-аналіз коефіцієнтів Пірсона для USP1-domain-1 та USP1-domain-2

Порівняльний BoxPlot-аналіз коефіцієнтів Пірсона для USP1-domain-1 та USP1-domain-2 (рис. 3.9) демонструє різний рівень кореляції сигналів між досліджуваними доменами та онкопротейном Bcr-Abl.

Для домену 1 значення коефіцієнта Пірсона зосереджені в дуже вузькому діапазоні (близько 0.05–0.07), що свідчить про низький ступінь лінійної кореляції

між сигналами флуоресценції. Низька варіабельність вказує на стабільно слабку колокалізацію між доменом 1 та Bcr-Abl.

Для домену 2 спостерігається значно ширший діапазон значень (приблизно від 0.08 до 0.34), а медіанне значення (~ 0.093) є вищим, ніж у домену 1. Це свідчить про тенденцію до більш вираженої кореляції між доменом 2 та Bcr-Abl, хоча дані характеризуються вищою варіабельністю.

Результати статистичного тесту Вілкоксона ($p = 0.114$) вказують на відсутність статистично значущої різниці між групами при обраному рівні значущості ($\alpha = 0.05$). Таким чином, незважаючи на видиму тенденцію до підвищених значень коефіцієнта Пірсона у домена 2, ці відмінності не можна вважати статистично підтвердженими.

У сукупності дані свідчать, що домен 2 потенційно характеризується більшою схильністю до колокалізації з онкопротеїном Bcr-Abl порівняно з доменом 1, однак наявні вибірки не забезпечують статистичної доказовості цієї різниці.

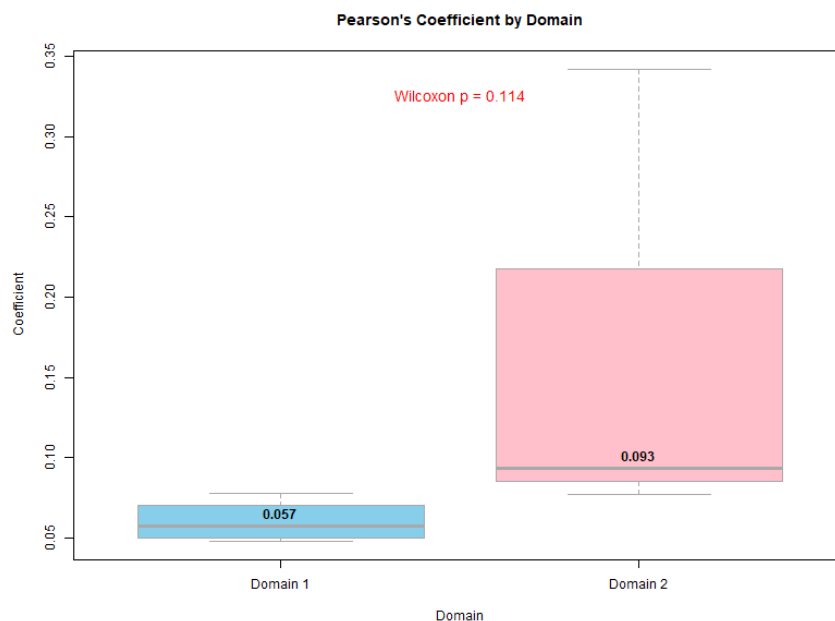


Рис. 3.9 Порівняльний BoxPlot-аналіз коефіцієнтів Пірсона для USP1-domain-1 та USP1-domain-2 у клітинах K562. Представлено розподіл значень коефіцієнта Пірсона для обох доменів білка USP1. Червоним позначено р-значення критерію Вілкоксона ($p = 0.114$), яке свідчить про відсутність статистично значущих відмінностей між групами.

3.5.2.1 Порівняльний BoxPlot-аналіз коефіцієнтів Мандерса (original) для USP1-domain-1 та USP1-domain-2

BoxPlot-аналіз коефіцієнтів Мандерса (original) для USP1-domain-1 та USP1-domain-2 (рис. 3.10) демонструє низький рівень колокалізації в обох групах, що відповідає загальній тенденції, виявленій за коефіцієнтом Пірсона.

Для домену 1 значення коефіцієнтів Мандерса зосереджені в дуже вузькому діапазоні (~ 0.001 – 0.003), а медіана становить близько 0.002. Це свідчить про мінімальну частку сигналу USP1-domain-1, що перекривається із сигналом Bcr-Abl.

Для домену 2 діапазон коефіцієнтів ширший (~ 0.003 – 0.02), а медіанне значення (~ 0.004) є удвічі більшим, ніж у домену 1, що вказує на тенденцію до більшого перекриття сигналів. Проте варіабельність значно вища, що відображає нестабільність взаємного розташування сигналів USP1-domain-2 та Bcr-Abl.

Критерій Вілкоксона ($p = 0.208$) не виявив статистично значущих відмінностей між доменами при рівні значущості $\alpha = 0.05$. Отже, попри візуальну тенденцію до дещо вищих значень Мандерса для домену 2, доказового збільшення частки колокалізації не встановлено.

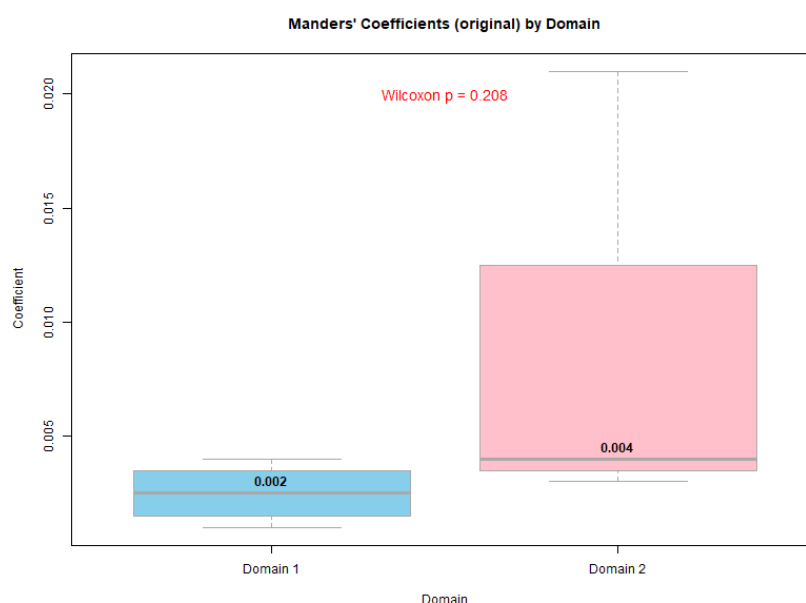


Рис. 3.10 Порівняльний BoxPlot-аналіз коефіцієнтів Мандерса (original) для

USP1-domain-1 та USP1-domain-2 у клітинах K562. Наведений розподіл значень Мандерса для обох доменів. р-значення критерію Вілкоксона ($p = 0.208$) свідчить про відсутність статистично значущої різниці між групами.

3.5.2.2 Порівняльний VoxPlot-аналіз коефіцієнтів Мандерса з урахуванням порогового значення для USP1-domain-1 та USP1-domain-2

Побудований VoxPlot (рис. 3.11) відображає розподіл коефіцієнта Мандерса M1, розрахованого з використанням порогового значення для каналів imgA та imgB, що дозволяє оцінити лише перекриття інтенсивності сигналів, які перевищують фоновий рівень. Таким чином, наведені значення характеризують реальну частку сигналу USP1, що колокалізується з Bcr-Abl, без внеску низькоінтенсивного шуму.

Для USP1-domain-1 значення M1 зосереджені у вузькому інтервалі (приблизно 0.001–0.003) з медіаною 0.002, що вказує на мінімальний відсоток сигналу домену 1, який перекривається з Bcr-Abl у межах інтенсивних, порогових пікселів.

Для USP1-domain-2 значення мають ширший діапазон (близько 0.003–0.02) з медіаною 0.004, що хоча й вказує на дещо вищий рівень інтенсивного перекриття сигналів, проте характеризується значною варіабельністю між зразками.

Статистичний аналіз (критерій Вілкоксона, $p = 0.208$) підтверджує, що різниця між доменами не є статистично значущою, незважаючи на тенденцію до вищих значень M1 у домені 2.

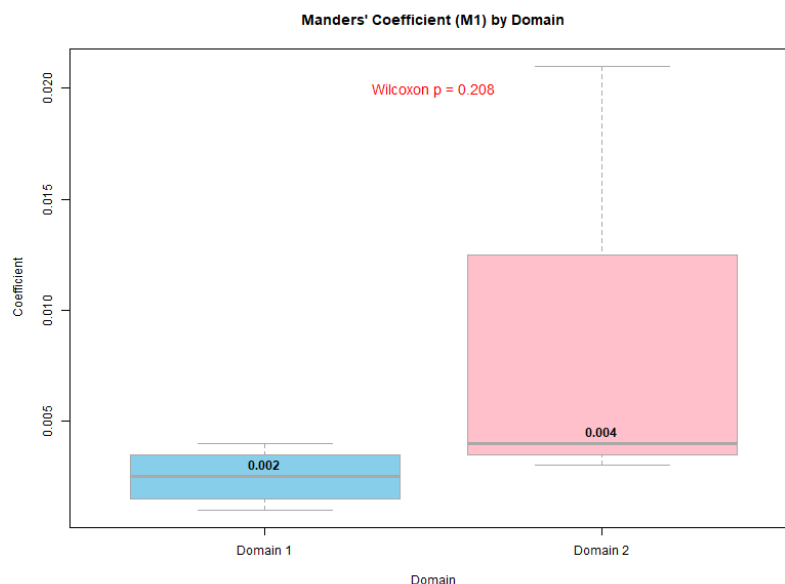


Рис. 3.11 BoxPlot-аналіз коефіцієнта Мандерса M1 (з використанням порогового значення для imgA та imgB) для доменів USP1-domain-1 та USP1-domain-2 у клітинах K562. Показано розподіл значень M1 для двох доменів; статистичний тест Вілкоксона ($p = 0.208$) не виявив достовірних відмінностей між групами.

Узагальнюючи результати конфокальної візуалізації та подальшого кількісного аналізу коефіцієнтів Пірсона та Мандерса (у тому числі з використанням порогових значень), можна зробити висновок, що обидва домени білка USP1 демонструють низький рівень колокалізації з онкопротеїном Bcr-Abl у клітинах лінії K562.

Хоча для USP1-domain-2 у ряді зразків спостерігається тенденція до підвищення значень коефіцієнтів, порівняно з USP1-domain-1, статистично значущих відмінностей між доменами не виявлено, що підтверджено тестом Вілкоксона для всіх параметрів ($p > 0.05$).

Таким чином, отримані дані свідчать про відсутність стабільної та відтворюваної взаємодії або просторового перекриття між доменами USP1 та Bcr-Abl у межах досліджених умов. Виявлені поодинокі підвищені значення можуть бути пов'язані з локальними структурними особливостями клітин або варіабельністю експресії, проте не формують узгодженої біологічної тенденції.

Отримані результати створюють основу для подальших досліджень,

спрямованих на оцінку можливих транз'єєнтних або опосередкованих механїзмїв колокаляцїї USP1 з Bcr-Abl, а також для бїльш поглибленого аналязу повнорозмїрного бїлка USP1 та його регуляторних комплексїв.

Висновки до роздїлу 3

Результати дослїдження демонструють успїшне створення та верифїкацїю рекомбїнантних конструкцїй для експресїї доменїв бїлка USP1, що забезпечило можливїсть системного аналязу їх структурної органїзацїї та функцїональних характеристик. Структурний аналяз пїдтвердив наявнїсть ключових елементїв, якї визначають субклїтинну локаляцїю та потенцїйну здатнїсть доменїв до регуляторних взаємодїй. Кїлькїсний аналяз колокаляцїї з онкопротеїном Bcr-Abl засвїдчив вїдносно низький рївень стабїльної просторової колокаляцїї, з тенденцїєю до бїльшої участї домену 2, що може вїдображати його бїльш значущу роль у формуваннї активного бїлкового комплексу. Отриманї данї пїдкреслюють функцїональну рїзницю мїж доменами USP1 ї створюють надїйну експериментальну основу для подальших дослїжень механїзмїв колокаляцїї USP1 з Bcr-Abl у контекстї клїтинної моделї хронїчної мїєлоїдної лейкемїї.

ВИСНОВКИ

Проведене дослідження було спрямоване на аналіз доменної організації деубіквітази USP1 та оцінку її потенційної колокалізації з онкопротейном Bcr-Abl у клітинах хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ). Актуальність роботи визначається необхідністю глибшого розуміння механізмів регуляції Bcr-Abl, оскільки саме стабілізація цього онкопротейну часто лежить в основі розвитку резистентності до інгібіторів тирозинкінази. Дослідження доменної будови USP1 та визначення структур, відповідальних за колокалізацію з Bcr-Abl, відкриває перспективи для розробки нових таргетних терапевтичних стратегій.

У рамках роботи успішно створено дві генетичні конструкції - pECFP-C3-USP1-domain-1 та pECFP-C3-USP1-domain-2, що забезпечують окрему експресію функціональних доменів білка USP1. Коректність конструкцій була підтверджена за допомогою ПЛР, рестрикційного аналізу та секвенування. Подальша трансфекція клітинної лінії K562 забезпечила стабільну експресію доменів, що стало основою для проведення конфокальної мікроскопії та аналізу колокалізації білків.

На основі отриманих мікроскопічних та кількісних даних встановлено, що USP1-domain-2 демонструє вищий рівень колокалізації з онкопротейном Bcr-Abl, порівняно з USP1-domain-1. Конфокальні зображення та коефіцієнти Manders показали значний просторовий збіг сигналів domain-2 із Bcr-Abl, що дозволяє припустити наявність домен-специфічної участі цього фрагмента USP1 у формуванні білкових комплексів Bcr-Abl/USP1. На відміну від нього, domain-1 характеризується меншою інтенсивністю колокалізації, що свідчить про обмеженішу або опосередковану роль у взаємодії з онкопротейном.

Таким чином, отримані дані підтверджують гіпотезу про те, що окремі структурні модулі USP1 беруть нерівнозначну участь у регуляції стабільності та активності Bcr-Abl. Це відкриває перспективи для проектування селективних інгібіторів, здатних блокувати найбільш критичні ділянки USP1, відповідальні за підтримання онкогенної активності Bcr-Abl.

Разом із тим, дослідження має певні методологічні обмеження, притаманні

більшості робіт, що використовують доменну експресію у векторних конструкціях. Зокрема, структурна конформація ізольованих доменів може частково відрізнятись від їх природної інтеграції в повнорозмірний білок USP1. Крім того, робота не охоплювала аналіз каталітичної активності USP1 чи функціональних наслідків колокалізації доменів із Bcr-Abl. Подолати ці обмеження можливо шляхом проведення майбутніх досліджень, що включатимуть експресію повнорозмірного USP1 у мутантних варіантах, застосування методів CRISPR/Cas9 для редагування ендogenous USP1 та функціональні тести чутливості до інгібіторів тирозинкінази.

Незважаючи на зазначені обмеження, робота має вагомí переваги та значний науковий внесок. Створенí конструкції доменів USP1 можуть надалі служити інструментом для детального картування білкових взаємодій. Визначений домен-залежний характер колокалізації з Bcr-Abl створює нове експериментальне підґрунтя для вивчення ролі деубіквітиназ у прогресії ХМЛ та формує перспективу створення інноваційних терапевтичних підходів, спрямованих на руйнування стабілізуючих білкових комплексів онкопротеїну.

Отже, таким чином, можна підвести підсумки, що в ході роботи було досягнуто поставленої мети дослідження, а саме: створено генетичні конструкції pECFP-C3-USP1-domain-1 та pECFP-C3-USP1-domain-2 та експресовано рекомбінантні білки USP1-domain-1, USP1-domain-2 у клітинах ХМЛ. Встановлено, що саме USP1-domain-2 має вищу здатність до колокалізації з Bcr-Abl. Це суттєво розширює сучасні уявлення про регуляцію онкопротеїну Bcr-Abl і формує підґрунтя для створення нових стратегій таргетної терапії ХМЛ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Chereda B., Melo J.V. Natural course and biology of CML. *Annals of Hematology*. 2015; Vol.94, S2. P.107–121. doi: [10.1007/s00277-015-2325-z](https://doi.org/10.1007/s00277-015-2325-z).
2. Jabbour E., Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. *American Journal of Hematology*. 2020. Vol. 95, № 6. P. 691–709. doi:[10.1002/ajh.25792](https://doi.org/10.1002/ajh.25792).
3. Kang Z.-J., Liu Y, Xu L, et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chinese Journal of Cancer*. 2016. Vol. 35, № 1. doi:[10.1186/s40880-016-0108-0](https://doi.org/10.1186/s40880-016-0108-0).
4. Minciacchi V. R., Kumar R., Krause D. S. Chronic Myeloid Leukemia: A Model Disease of the Past, Present and Future. *Cells*. 2021. Vol. 10, № 1. P. 117. doi:[10.3390/cells10010117](https://doi.org/10.3390/cells10010117).
5. Nowell P. C., Hungerford D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960. Vol. 132, № 3438. C. 1497.
6. Rowley J. D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973. Vol. 243. P. 290–293.
7. Abdulmawjood B., Costa B., Roma-Rodrigues C., et al. Genetic Biomarkers in Chronic Myeloid Leukemia: What Have We Learned So Far? *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, № 22. P.12516. <https://doi.org/10.3390/ijms222212516>.
8. Hehlmann R. Chronic Myeloid Leukemia in 2020. *Hemasphere*. 2020. Vol. 4, №5. P. 468. doi: [10.1097/HS9.0000000000000468](https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000468).
9. Jabbour E., Kantarjian H. Chronic Myeloid Leukemia: A Review. *JAMA*. 2025. Vol. 33, № 18. P.1618–1629. doi:[10.1001/jama.2025.0220](https://doi.org/10.1001/jama.2025.0220).
10. Hehlmann R. The history of chronic myeloid leukemia (cml): from arsenic to tyrosine kinase inhibitors (TKI). *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*. 2025. Vol. 47. DOI:[10.1016/j.htct.2025.103867](https://doi.org/10.1016/j.htct.2025.103867).
11. Hochhaus A., Baccarani M., Silver R.T., et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020. Vol. 34, № 4. P. 966–984. doi:[10.1038/s41375-020-0776-2](https://doi.org/10.1038/s41375-020-0776-2).

12. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Nature Reviews Cancer*. 2005. Vol.5, № 3. P.172-183. DOI: [10.1038/nrc1567](https://doi.org/10.1038/nrc1567).
13. Antonenko S. V., Telegeev G. D. Inhibition of USP1, a new partner of BCR-ABL, results in decrease of BCR-ABL level in K562 cells. *Experimental Oncology*. 2020; Vol.42, № 2. P. 124–131 (опубл. у 2023). DOI: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-2.14533.
14. Антоненко С. В. РОЛЬ USP1, GLG1, ZNF217 у розвитку та прогресуванні Bcr-Abl-позитивної хронічної мієлоїдної лейкемії: дис. канд. біол. наук: 03.00.22. Київ: ІМБіГ НАНУ, 2020. С.157. URL: https://imbg.org.ua/docs/specscicouncil/20201124/Antonenko_disser.pdf.
15. Zhang X., Peng P., Bao L.W., Zhang A.Q., Yu B., Ubiquitin-Specific Protease 1 Promotes Bladder Cancer Progression by Stabilizing c-MYC. *Cells*. 2024. Vol.13, № 21. P. 1798. doi: 10.3390/cells13211798.
16. Jung J.K., Jang S.W., Kim J.M., et al. A novel role for the deubiquitinase USP1 in the control of centrosome duplication. *Cell Cycle*. 2016; Vol.15, № 4. doi: 10.1080/15384101.2016.1138185.
17. Timothy A. Yap, Nehal J. Lakhani, Amita Patnaik, et al. First-in-human phase I trial of the oral first-in-class ubiquitin specific peptidase 1 (USP1) inhibitor KSQ-4279 (KSQi), given as single agent (SA) and in combination with olaparib (OLA) or carboplatin (CARBO) in patients (pts) with advanced solid tumors, enriched for deleterious homologous recombination repair (HRR) mutations. *J Clin Oncol*. 2024. Vol. 42, № 16. DOI: [10.1200/JCO.2024.42.16_suppl.3005](https://doi.org/10.1200/JCO.2024.42.16_suppl.3005).
18. Simona Soverini, Caterina de Benedittis, Manuela Mancini, Giovanni Martinelli. Mutations in the BCR-ABL1 Kinase Domain and Elsewhere in Chronic Myeloid Leukemia. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*. 2015. Vol. 15. P. 120–128. DOI: [10.1016/j.clml.2015.02.035](https://doi.org/10.1016/j.clml.2015.02.035).
19. Soverini S, Mancini M, Bavaro L, Cavo M, Martinelli G. Chronic myeloid leukemia: the paradigm of targeting oncogenic tyrosine kinase signaling and counteracting

- resistance for successful cancer therapy. *Molecular Cancer*. 2018. Vol. 17, № 1. doi: 10.1186/s12943-018-0780-6.
20. Про що розповість загальний аналіз крові. URL: <https://dila.ua/news/122019-oak.html> (дата звернення 08.03.25).
21. Fabio P. S. Ravandi F. Advances in treatment of chronic myelogenous leukemia – new treatment options with tyrosine kinase inhibitors. *Leuk Lymphoma*. 2014. doi: [10.3109/10428190903383427](https://doi.org/10.3109/10428190903383427).
22. Ahmad Hamad, Zeyad Sahli, Maya El Sabban, et al. Emerging therapeutic strategies for targeting chronic myeloid leukemia stem cells. *Stem Cells*. 2013. DOI: [10.1155/2013/724360](https://doi.org/10.1155/2013/724360).
23. Flis S. Chojnacki T. Chronic myelogenous leukemia, a still unsolved problem: pitfalls and new therapeutic possibilities. *Drug Design, Development and Therapy*. 2019. Vol.13. P. 825–843. DOI:[10.2147/DDDT.S191303](https://doi.org/10.2147/DDDT.S191303).
24. Mahon F.X. Treatment-free remission in CML: who, how, and why? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2017. Vol.8, № 1. P.102-109. doi: 10.1182/asheducation-2017.1.102.
25. Jorge E. Cortes, Dong-Wook Kim, Javier Pinilla-Ibarz, Philipp D. le Coutre, Ronald Paquette, et al. Ponatinib efficacy and safety in Philadelphia chromosome–positive leukemia: final 5-year results of the phase 2 PACE trial. *Blood* 2018. Vol.132, № 4. P. 393–404. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-739086>.
26. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2025 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol*. 2024. Vol.99, №11. P. 2191-2212. doi:[10.1002/ajh.27443](https://doi.org/10.1002/ajh.27443).
27. Bakkar M., Khalil S., Bhayekar K., et al. Ubiquitin-Specific Protease Inhibitors for Cancer Therapy: Recent Advances and Future Prospects. *Biomolecules*. 2025. Vol.15, № 2. P. 240. doi: [10.3390/biom15020240](https://doi.org/10.3390/biom15020240).
28. Cutler J. A. Differential signaling through p190 and p210 BCR-ABL fusion proteins revealed by interactome and phosphoproteome analysis. *Leukemia*. 2017. Vol. 31, № 7. P.1513–1524. doi: [10.1038/leu.2017.61](https://doi.org/10.1038/leu.2017.61).

29. Fernandes A, Shanmuganathan N, Branford S. Genomic Mechanisms Influencing Outcome in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancers*. 2022. Vol. 14, № 3. P. 620. <https://doi.org/10.3390/cancers14030620>
30. Hai A., Kizilbash N.A., Zaidi S.H., et al. Differences in structural elements of Bcr-Abl oncoprotein isoforms in Chronic Myelogenous Leukemia. *Bioinformation*. 2014. Vol. 10, № 3. P. 108–114. doi:10.6026/97320630010108.
31. Reckel S., Gehin C., Tardivon D., et al. Structural and functional dissection of the DH and PH domains of oncogenic Bcr-Abl tyrosine kinase. *Nature Communications*. 2017. Vol. 8, № 1. DOI:10.1038/s41467-017-02313-6.
32. Gurianov D. S., Antonenko S. V., Telegeev G. D. Colocalization of cortactin and PH domain of BCR in HEK293T cells and its potential role in cell signaling. *Biopolymers and Cell*. 2016. Vol. 32. № 1. P 26–33. doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000909>.
33. Антоненко С., Кравчук І., Гур'янов Д., Телегєєв Г. Білки партнери РН домену протеїна Bcr-Abl: створення генетичних конструкцій для виявлення молекулярних особливостей розвитку ХМЛ. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017; том 20. С.47-52.
34. Mevissen T.E.T., Komander D. Mechanisms of Deubiquitinase Specificity and Regulation. *Annual Review of Biochemistry*. 2017. Vol. 86, № 1. P. 159–192 doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044916.
35. Liang X.-W., Wang S.-Z., Liu B. A review of deubiquitinases and thier roles in tumorigenesis and development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023. Vol. 11. doi:10.3389/fbioe.2023.1204472.
36. Atanassov B. S. The Role of Deubiquitinating Enzymes in Chromatin Regulation. *FEBS Letters*. 2010. Vol. 585, №13. P. 2016–2023. doi:10.1016/j.febslet.2010.10.042.
37. UniProt. URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/O94782/entry#sequences>. (дата звернення 08.03.25).
38. Antonenko S., Zavelevich M., Telegeev G. The role of USP1 deubiquitinase in the pathogenesis and therapy of cancer. *Acta Biochimica Polonica*. 2023. Vol. 70, №2. P. 219-231. https://doi.org/10.18388/abp.2020_6636.

- 39.Dharadhar S., Dijk W.J., Scheffers S, et al. Insert L1 is a central hub for allosteric regulation of USP1 activity. *EMBO reports*. 2021. Vol. 22, № 4. <https://doi.org/10.15252/embr.202051749>.
- 40.Nishchenko D., Antonenko S., Guryanov D., Telegeev G. Features of expression and localization of USP1 in different types of malignant neoplasms. *Experimental factors of organism evolution*. 2024. Vol. 34, P.88-94. DOI: 10.7124/FEEO.v34.1622. [in Ukrainian].
- 41.SIGMA-ALDRICH. TRIS Acetate-EDTA buffer. URL: https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/270/651/t4038pis.pdf?srsltid=AfmBOopOL2GS5qippSZ3YIgAI6svxxqHnWIokcYME4s5l6rVfblXPAqf&utm_source=chatgpt.com (дата звернення 12.11.25).
- 42.Vutukuru, M.R., Sharma, D.K., Chakraborty, I. et al. A rapid and high-yield method for nucleic acid extraction. *Scientific Reports*. 2025. Vol. 15, № 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-95226-0>.
- 43.Thermo Fisher Scientific. Purification of Genomic DNA Using. PureLink Silica Columns. URL: https://www.thermofisher.com/ua/en/home/references/protocols/nucleic-acid-purification-and-analysis/dna-extraction-protocols/purification-of-genomic-dna.html?utm_source=chatgpt.com (дата звернення 12.11.25).
- 44.Lezin G., Kosaka Y., H. et al. A One-Step Miniprep for the Isolation of Plasmid DNA and Lambda Phage Particles. *PLoS ONE*. 2011. Vol. 6, № 8. P.e23457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023457>
- 45.Sigma Aldrich. TBST for Western Blotting. URL: https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/support/calculators-and-apps/1x-tris-buffered-saline-tween-20?srsltid=AfmBOoqWxMxspVt1SeDztBZ3Z2OG9F02jyszyyQOixvQ3lRk6woQCIT-&utm_source=chatgpt.com (дата звернення 12.11.25).
- 46.Myers Lab Cell Culture Protocol for K562. URL: <https://www.encodeproject.org/documents/ab1da64d-6e92-47fe-9796->

[33a0e8c6b38d/%40%40download/attachment/ENCODE3_HAIB_K562CellProtocol.pdf?utm_source=chatgpt.com](https://www.encodeproject.org/33a0e8c6b38d/%40%40download/attachment/ENCODE3_HAIB_K562CellProtocol.pdf?utm_source=chatgpt.com) (дата звернення 12.11.25).

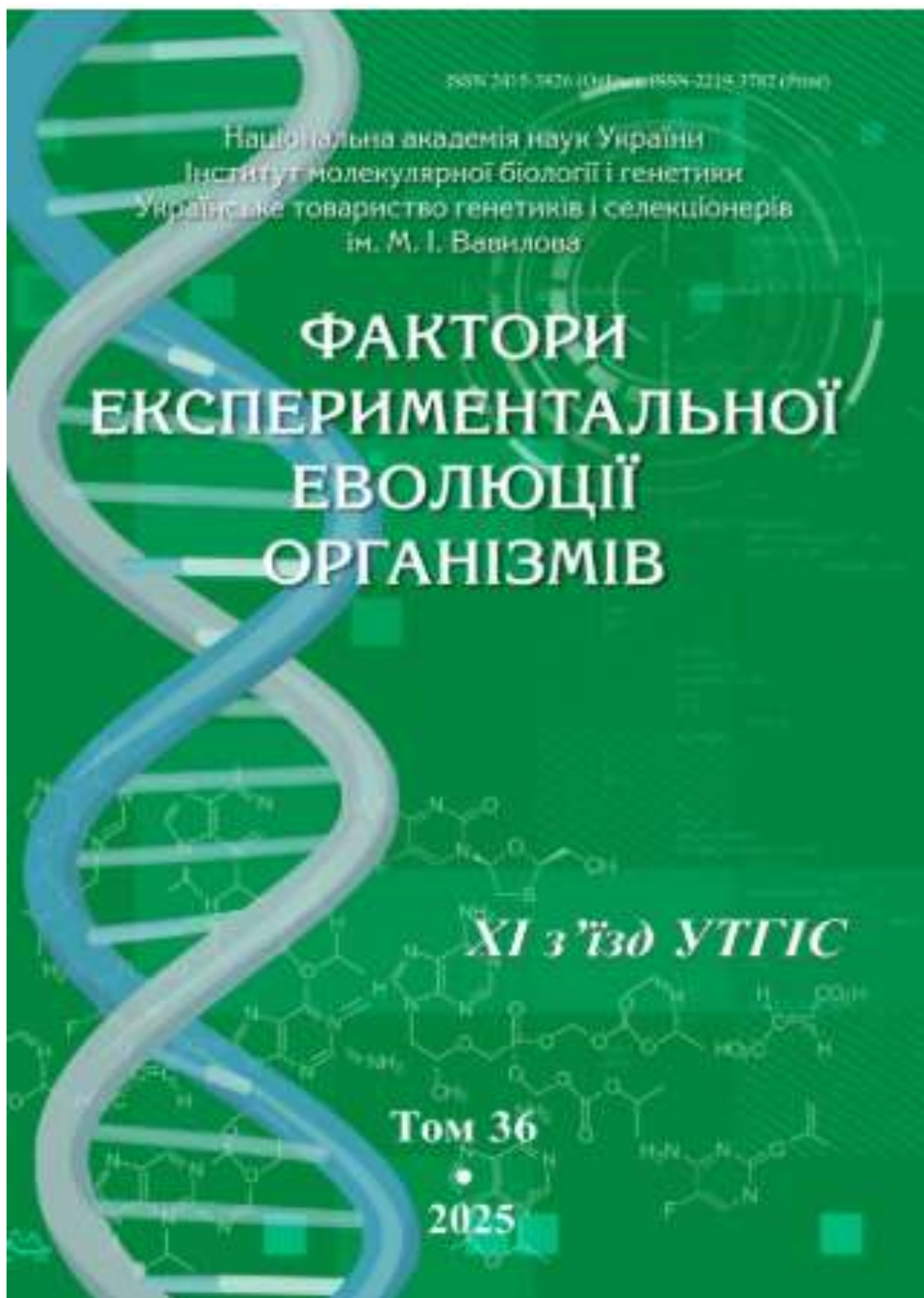
47. Sigma Aldrich. Bovine Serum Albumin (BSA) Blocking Buffer. URL: https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/support/calculators-and-apps/bsa-blocking-buffer?srltid=AfmBOorxM_HLJyEVXsMHMNuuhSlwad2jkLLgXTyWKbwH7vk-iyqSTOby&utm_source=chatgpt.com (дата звернення 12.11.25).
48. Besse L, Rumiak T, Reynaud-Angelin A, et al. Protocol for automated multivariate quantitative-image-based cytometry analysis by fluorescence microscopy of asynchronous adherent cells. 2023. Vol.4, № 3. doi: 10.1016/j.xpro.2023.102446.
49. Mowiol mounting solution URL: https://www.okayamaui.ac.jp/user/organell/assets/Mowiol_mounting_solution.pdf?utm_source=chatgpt.com (дата звернення 12.11.25).
50. Molecular designs. Bacterial Medium: LB Broth. URL: https://research.molecular designs.com/bacterial-medium-lb-broth/?utm_source=chatgpt.com (дата звернення 12.11.25).
51. Kurahina N V., Sklyar T. V. et al. Genetic transformation of Escherichia coli cells with different degrees of competence with R-plasmids. *Bulletin of Problems Biology and Medicine*. 2024. Vol. 1, № 1. P. 371. DOI: 10.29254/2077-4214-2024-1-172-371-380.
52. Matvieienko A.S., Antonenko S.V., Guryanov D.S., Telegeev G.D. Creation of genetic constructs pECFP-C3-USP1-domain-1 and pECFP-C3-USP1-domain-2 for analysis of the functional role of USP1 domains and their role in the formation of the USP1/Bcr-Abl protein complex in chronic myeloid leukemia cells. *Book of Abstracts of XIX All-Ukrainian Conference of Young Scientists. May 20–21, 2025, Kyiv, Ukraine*. P. 60.
53. Matvieienko A. S., Antonenko S. V., Guryanov D. S., G. D. Telegeev. Generation of recombinant constructs pECFP-C3-USP1-domain-1 and pECFP-C3-USP1-domain-2 as key tools for studying the domain organization of USP1 and its interaction with the oncoprotein Bcr-Abl. *Molecular genetics and genomics*. 2025. Vol 36, C.69-74. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEE0.v36.1715>

54. Shi R., Lewis R.S., Panthee D.R. Filter paper-based spin column method for cost-efficient DNA or RNA purification. *PLoS One*. 2018 Vol. 13, № 12. P.e0203011. doi: 10.1371/journal.pone.0203011.
55. CaCl₂ Competent Cells. URL: <https://www.cmbe.engr.uga.edu/protocols/CaCl2%20Competent%20Cells.pdf> (дата звернення 12.11.25).
56. Akligoh H., Molloy J. Chemically Competent Cell Preparation [Calcium Chloride Method]. 2022. DOI: [dx.doi.org/10.17504/protocols.io.261ge4k8dv47/v1](https://doi.org/10.17504/protocols.io.261ge4k8dv47/v1)
57. Dunn K.W., Kamocka M.M., McDonald J.H. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2011. Vol. 300. № 4. P. 723–742. DOI: 10.1152/ajpcell.00462.2010.
58. ImageJ. URL: <https://imagej.net/> (дата звернення 25.11.25).
59. Schindelin J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. 2012. Vol. 9, № 7. P. 676–682. DOI: 10.1038/nmeth.2019.
60. Colocalization Microscopy and Analysis Basics. URL: <https://www.kolaido.com/the-principles-of-colocalization-microscopy-and-image-analysis/> (дата звернення 25.11.25).
61. JACoP. URL: <https://imagej.net/ij/plugins/track/jacop2.html> (дата звернення 25.11.25).
62. Матвеєнко А.С., Грецький І.О. Застосування мови програмування R для ефективного вивчення біоінформатики та аналізу біологічних даних // Матеріалів III Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції «Освітньо-наукові інновації у сфері біології, збереження здоров'я людини та психосоціальної і фізичної реабілітації» (15 листопада 2024 р. м. Рівне). С. 123-130.
63. Матвеєнко А.С., Грецький І.О. Мова програмування R як зручна платформа для планування дослідження та аналізу результатів біологічних експериментів // Матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Інноваційні практики наукової освіти» (11–16 грудня 2024 року, м. Київ). С. 544-548.
64. Матвеєнко А.С., Грецький І.О. Можливості дизайну біотехнологічних експериментів у середовищі R. // Матеріали XVI Всеукр. наук.-практ. конф. для

молодих учених та здобувачів освіти «Сучасні інформаційні технології в освіті і науці» (10-11 квіт. 2025 р., м. Умань). С.152-155.

- 65.Матвєєнко А.С., Грецький І.О. Мова програмування R як платформа для машинного навчання і аналізу даних біологічних досліджень. // Матеріали Міжнародної наукової конференції «Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування» (14-15 травня 2025 р., м. Харків). С.344-346. Режим доступу: <http://btu.kharkov.ua/nauka/konferentsiyi/>.
- 66.Ahmed M., Lai T.H., Kim D.R. colocr: an R package for conducting co-localization analysis on fluorescence microscopy images. *PeerJ*. 2019. Vol.7. P.e7255. doi: 10.7717/peerj.7255.
- 67.Sauvat A., Leduc M., Müller K., et al. ColocalizR: An open-source application for cell-based high-throughput colocalization analysis. *Computers in Biology and Medicine*. 2019. Vol. 107. P. 227–234. doi: 10.1016/j.compbiomed.2019.02.024.

ДОДАТКИ
ДОДАТОК А



Національна академія наук України
Інститут молекулярної біології і генетики
Українське товариство генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова

**ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ
ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ**

**FACTORS IN EXPERIMENTAL
EVOLUTION OF ORGANISMS**

Збірник наукових праць

Видається з 2003 р.

ТОМ 36

Присвячено

120-річчю від дня народження Ервіна Чаргаффа

Київ – 2025

- Блюм Р. Я., Демидов С. В., Пірко Я. В., Блюм Я. Б. Ідентифікація генів тубуліну у амфідиплоїдних представників роду *Brassica* та їх батьківських видів
- Галаєв О. В., Галаєва М. В. Виявлення та ідентифікація штамінів вірусів жовтої карликовості в посівах м'якої пшениці на півдні України та в Угорщині
- Галаєва М. В., Галаєв О. В., Гарєєв О. Л. Розробка ПЦР тест-системи для детекції коронавірусної хвороби котів
- Галаєва М. В., Галаєв О. В., Погребнюк О. О., Файт В. І., Рахматов М. Ідентифікація алелю *Glu-B1a1*, що кодує надекспресовану високомолекулярну субодиницю глютеніну Bx7^{oe}, в лініях пшениці з використанням KASP-технологій
- Курчій Б. О. До питання біологічних рецепторів: фундаментальні дані, які було забуто або знехтувано
- Матвієнко А. С., Антоненко С. В., Гур'янов Д. С., Телегєєв Г. Д. Створення рекомбінантних конструкцій pECFP-C3-USP1-domain-1 та pECFP-C3-USP1-domain-2 як ключових інструментів вивчення доменної організації білка USP1 та їх ролі у взаємодії з онкобілком Bcr-Abl
- Новожилов Д. О., Рабоконь А. М., Блюм Р. Я., Демкович А. Є., Приваліхін С. М., Михайлова Д. М., Пірко Я. В., Блюм Я. Б. Створення ПР-маркерів для аналізу генів β -тубуліну у базидієвих грибах
- Осташ Б. О., Вознюк А. В., Цедюляк В.-М. С., Федоренко В. О. Нові дані щодо регуляції спеціалізованого метаболізму *Streptomyces viridosporus* ATCC14672
- Сандецька Н. В., Радченко О. М., Шегада І. М. Частота алелів локусів запасних білків у сортах української селекції
- 40 Blume R. Y., Demidov S. V., Pirko Y. V., Blume Y. B. Identification of tubulin genes in amphidiploid representatives of the genus *Brassica* and their parent species
- 47 Halaiev O. V., Halaieva M. V. Detection and identification of yellow dwarf virus strains in soft wheat crops in southern Ukraine and Hungary
- 52 Halaieva M. V., Halaiev O. V., Gareev O. L. Development of a PCR test system for detecting feline coronavirus disease
- 58 Halaieva M. V., Halaiev O. V., Pogrebniuk O. O., Fait V. I., Rahmatov M. Identification of the *Glu-B1a1* allele encoding the overexpressed high-molecular-weight glutenin subunit Bx7^{oe} in wheat lines using KASP technology
- 64 Kurchii B. A. On the issue of biological receptors: fundamental data that have been forgotten or neglected
- 69 Matviienko A. S., Antonenko S. V., Gur'yanov D. S., Telegeev G. D. Generation of recombinant constructs pECFP-C3-USP1-domain-1 and pECFP-C3-USP1-domain-2 as key tools for studying the domain organization of USP1 and its interaction with the oncoprotein Bcr-Abl
- 75 Novozhilov D. O., Rabokon A. M., Blume R. Y., Demkovych A. Y., Pryvalikhin S. M., Mykhailova D. M., Pirko Ya. V., Blume Ya. B. Design of ILP markers for β -tubulin genes analysis in basidiomycete fungi
- 82 Ostash B. O., Voznyuk A. V., Tseduliak V.-M. S., Fedorenko V. O. New insights into regulation of specialized metabolism of *Streptomyces viridosporus* ATCC14672
- 87 Sandetska N. V., Radchenko O. M., Sheheda I. M. Allele frequency of reserve protein loci in Ukrainian breeding varieties

ЕКОГЕНЕТИКА

Ємелянов В. І., Бобошко О. П., Міхєєв О. М., Ковбасенко Р. В., Симоненко Ю. В., Швартау В. В. УФ-В індуковане накопичення калози у рослин озимої пшениці

ECOLOGICAL GENETICS

93 Emelyanov V. I., Boboshko O. P., Mikhaylov A. M., Kovbasenko R. V., Symonenko Yu. V., Schwartau V. V. UV-induced accumulation of callose in winter wheat plants

МАТВЄЄНКО А. С.^{1,2}, АНТОНЕНКО С. В.¹, ГУР'ЯНОВ Д. С.¹, ТЕЛЕГЕСЬ Г. Д.¹¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, ORCID: 0000-0003-0212-3779, 0000-0003-0594-2286, 0000-0003-0270-4397² Київський національний університет технологій та дизайну, Україна, 01011, м. Київ, вул. Мала Шияновська, 2

✉ matvieienkoqyastasia@gmail.com, 0509352861

СТВОРЕННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ КОНСТРУКЦІЙ pECFP-C3-USP1-DOMAIN-1 ТА pECFP-C3-USP1-DOMAIN-2 ЯК КЛЮЧОВИХ ІНСТРУМЕНТІВ ВИВЧЕННЯ ДОМЕННОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ БІЛКА USP1 ТА ЇХ РОЛІ У ВЗАЄМОДІЇ З ОНКОБІЛКОМ BCR-ABL

Мета. Створення рекомбінантних конструкцій pECFP-C3-USP1-domain-1 та pECFP-C3-USP1-domain-2, необхідних для вивчення особливостей доменної організації білка USP1, визначення їх ролі у функціонуванні USP1 та взаємодії із онкобілком Bcr-Abl. **Методи.** У дослідженні використовувались стандартні методи молекулярного клонування, включаючи зокрема ПЛР, лігування, рестрикція, методи виділення та очищення ДНК. **Результати.** Були змодельовані та успішно отримані генетичні конструкції pECFP-C3-USP1-domain-1 та pECFP-C3-USP1-domain-2, що кодують ключові домени білка USP1. **Висновки.** Отримані генетичні конструкції pECFP-C3-USP1-domain-1 та pECFP-C3-USP1-domain-2, будуть використані для вивчення ролі доменів у функціонуванні білка USP1, його субклітинної локалізації та особливостей утворення білкового комплексу Bcr-Abl/USP1, що сприятиме кращому розумінню його ролі у клітинних процесах та розвитку нових терапевтичних підходів у лікуванні ХМЛ.

Ключові слова: хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ), онкобілок Bcr-Abl, убіквітин-специфічних протеаз (USPs), USP1, домени USP1.

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) це клональне мієлопроліферативне захворювання, що характеризується реципрокною транслокацією t(9;22), яка виникає у гемопоетичних стовбурових клітинах [1]. Ця транслокація спричиняє злиття гена Абелясона (ABL1) з хромосоми 9q34 та гена кластерної області точки розриву (BCR) на хромосомі 22q11.2, що призводить до утворення так званої філадельфійської (Ph) хромосоми [2]. Молекулярним наслідком цієї транслокації є формування злитого онкогену Bcr-Abl, який кодує конститутивно активну тирозинкіна-

зу. Аномальна конститутивна активність цієї тирозинкінази визначає патогенез ХМЛ [3].

USP1 є членом родини убіквітин-специфічних протеаз (USPs). USPs беруть участь у багатьох ключових клітинних процесах, зокрема, відповіді на пошкодження ДНК, апоптозі, передачі сигналів, стійкості до лікарських засобів [4]. Дисфункція USPs асоціюється з розвитком ряду захворювань, включаючи онкопатології. Відомо, що ракові клітини з високим рівнем білкового обміну є більш чутливими до інгібіторів протеасом та деубіквітиназ. Це підкреслює важливість USPs у патогенезі та терапевтичному підході до лікування онкологічних захворювань [5]. Розробка та впровадження інгібіторів USPs відкриває нові можливості у лікуванні раку та інших захворювань, пов'язаних із порушеннями білкової деградації [4, 5]. USP1 є одним із найкраще вивчених деубіквітинуючих ферментів (DUB). Відомо, що підвищена експресія USP1 спостерігається при різних видах раку, включаючи гліому, остеосаркому, лейкемію, рак шлунка, молочної залози, яєчників, простати та інші форми онкопатологій [6]. Це корелює з агресивністю пухлин і зниженими показниками виживаності пацієнтів [7]. USP1 бере участь у регуляції ключових клітинних процесів, таких як: метаболізм, проліферація, апоптоз. Основна роль USP1 полягає у підтриманні балансу між убіквітуванням та деубіквітуванням, що важливо для функціонування сигнальних мереж і клітинного гомеостазу. Порушення цього балансу сприяє онкогенезу. USP1 також модулює стабільність онкобілків і білків-супресорів пухлин, що робить його важливим діагностичним маркером і перспективною терапевтичною мішенню для боротьби з раком [7].

У результаті попередніх досліджень ми виявили новий білковий комплекс Bcr-Abl/USP1

© МАТВЄЄНКО А. С., АНТОНЕНКО С. В., ГУР'ЯНОВ Д. С., ТЕЛЕГЕСЬ Г. Д.

Матвєєнко А. С., Антоненко С. В., Гур'янов Д. С., Телегєєв Г. Д.

та продемонстрували, що USP1 модулює рівень онкобілка в клітинах ХМЛ, що робить його багатообіцяючою терапевтичною мішенню для лікування ХМЛ [8]. Однак механізм, що лежить в основі взаємодії між онкобілком Bcr-Abl і деубіквітиназою USP1, залишається невідомим. У цій роботі ми змоделювали та створили генетичні конструкції з різними доменами USP1, що дозволить не лише встановити їхню роль у функціонуванні деубіквітинази, а й детально вивчити механізми утворення білкового комплексу Bcr-Abl/USP1, що є важливою умовою для розуміння патогенезу ХМЛ та розробки нової стратегії терапії захворювання.

Матеріали і методи

Ампліфікація цільових послідовностей доменів гена USP1. Для ампліфікації кодуючих послідовностей доменів гена USP1 були підібрані праймери, послідовності яких вказані в таблиці. Підбір праймерів проводили за допомогою програми Serial Cloner 2.6.1.

Матрицею для підбору праймерів та ПЛР слугувала генетична конструкція pECFP-C3-USP1, що містить кДНК цільових послідовностей. ПЛР проводили за допомогою ПЛР-ампліфікатора Eppendorf Master Cycler Personal (США). Компоненти ПЛР відповідали умовам виробника (Thermo Scientific) з використанням високоточної Pfu-полімерази. ПЛР проводили за наступних умов: початкову денатурацію ДНК – 5 хв при 95°C. Денатурація ДНК – 30 с при 95°C. Відпал праймерів – 30 с при 60°C. Елонгація тривала 1 хв при 72°C. Для напрацювання ДНК в необхідній кількості стадії 2–4 повторювали 29 разів. Кінцева елонгація проводилась 5 хв при 72°C. Успішність ампліфікації оцінювали за допомогою електрофорезу в агарозному гелі за стандартних умов.

Виділення ампліфікованих фрагментів ДНК із агарозного геля. Виконали електрофоретичне розділення нуклеїнових кислот в агарозному гелі, визначили розміри і розташування фрагментів ДНК та вирізали з гелю смужку, яка несе бажаний фрагмент. Гель з фрагментом ДНК зважували та додали трикратний об'єм (3X) адсорбційного буфера. Інкубували 10 хв при 50°C. Отриману суспензію вносили до колонки Whatman GF/C зі скловолоконними фільтрами з діаметром пор 1.2 μm та центрифугували при 8 000 g 2 хв. Отриманий осад промивали буферами та розчинили в потрібному об'ємі дисти-

льованої води. Виміряли концентрацію ДНК на спектрофотометрі.

Отримання генетичних конструкцій. Створення генетичних конструкцій для експресії цільових послідовностей та рестрикційний аналіз були змодельовані програмою Serial Cloner 2.6.1. Для клонування кодуючих послідовностей доменів USP1 був використаний pECFP-C3, який у кількості 5 мкг обробляли однією одиницею по 0,3 мкл (3 U) відповідних рестриктаз. Ампліфіковану кодуючу послідовність USP1-domain-1 інкубували з ендонуклеазами BamHI та SalI. Після цього вставку USP1-domain-1 лігували у вектор pECFP-C3, який попередньо був порізаний за сайтами рестрикції SalI та BglI. Для створення генетичної конструкції pECFP-C3-USP1-domain-2 вектор pECFP-C3 обробили ендонуклеазами рестрикції BamHI та SalI. Ампліфіковану кодуючу послідовність USP1-domain-2 інкубували з ендонуклеазами BamHI та SalI. За допомогою інструменту Double Digest Calculator визначили оптимальні умови проведення реакції рестрикції та підбрали буферні розчини. Рестрикційна суміш інкубувалась впродовж години при 37°C з подальшою термоінактивацією при 80°C протягом 20 хвилин. Для проведення лігування було взято молекулярне співвідношення вектора до вставки 1:3. До складу реакційної суміші було внесено: 200 ng плазмідної ДНК, 600 ng USP1-domain-1 та USP1-domain-2 відповідно, 5 U T4-ДНК-лігази (Thermo Scientific), 0,5 mM АТФ, однократний (1X) лігазний буфер. Реакцію проводили впродовж 24 годин при 20°C з наступною 20-хвилинною інактивацією при 75°C, додаванням ферменту-кілера EcoRI до суміші, де це необхідно, інкубацією 30 хвилин при 37°C з наступною 20-хвилинною інактивацією при 65°C. Для проведення контролю була проведена та сама реакція лігування, але без вставки доменів у вектор.

Трансформація. Лігазну суміш трансформували у компетентні клітини *E. coli* TOP10 висівали на чашки з LB агаром з 100 мкг/мл канаміцину та інкубували при 37°C протягом доби. Отримані колонії висівали в рідке середовище LB з 100 мкг/мл канаміцину та нарощували протягом 18 годин. Плазмідні з рідкого середовища виділяли методом лізису неіонними детергентами.

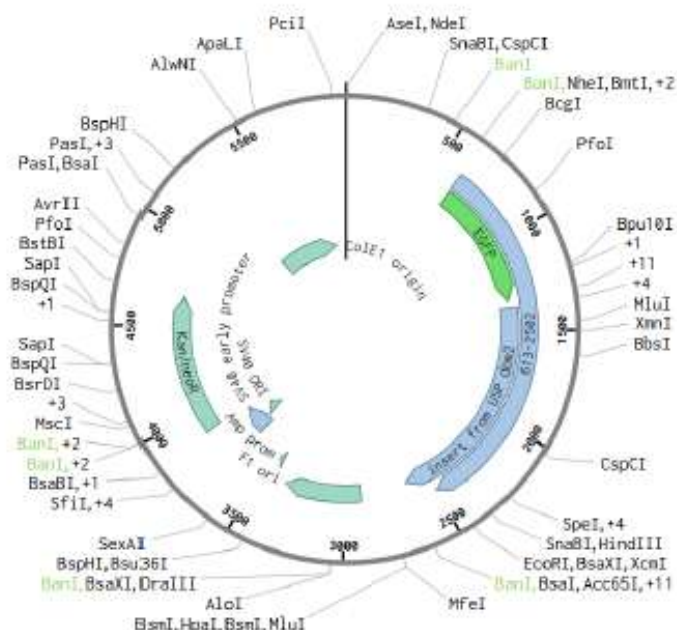


Figure 1. The effect of the number of nodes on the accuracy of the proposed method. The accuracy of the proposed method is plotted against the number of nodes. The accuracy is high and stable for all numbers of nodes, indicating that the proposed method is robust to the number of nodes.

активність і регуляцію. Перша вставка (L1) кодується 618 п.н, складається з 206 амінокислот та локалізується в межах 227–433 амінокислотних залишків. L1 посилює активність USP1 шляхом зв'язування з ДНК і алостеричної активації при взаємодії з кофактором UAF1, а також бере участь у фосфорилуванні, містить NLS та деградуючий мотив. Друга вставка (L2) закодована в гені USP1 426 п.н та складається з 142 амінокислот що охоплюють залишки 602–744. L2 містить сайт авторозщеплення, який регулює функцію USP1 [10]. Третя найменша вставка L3 розташована між 465–483 амінокислотними залишками. Вважається, що інсерції L1 і L3 разом здатні викликати аутоінгібування, яке може бути скасовано шляхом зв'язування з кофактором UAF1. Спільна делеція L1 і L3 призводить до гіперактивації USP1, тоді як видалення вставки L2 або L3 не впливає на його ферментативну активність [11]. Скоординована взаємодія між цими вставками, зокрема L1 і L3, керує аутоінгібуванням і активацією USP1, при цьому мутації в цих областях впливають на ферментативну активність. Ці три домени називають каталітичною тріадою USP1, вони є основою для його деубіквітинуючої активності [5].

Вивчення структурної будови гена та білка USP1 є ключовим фактором для розуміння його функцій, властивостей, можливості взаємодії із онкобілком Bcr-Abl та впливом на патогенез ХМЛ. Білок USP1 кодується 785 амінокислотами з передбаченою молекулярною масою 88,2 кДа [9]. Структурна організація білка USP1 складається з декількох функціональних частин. Основний каталітичний домен USP1 включає: C90 – каталітичний залишок С-боксу, H593 і D751 – залишки His-боксу [5]. Ці каталітичні залишки утворюють ферментативне ядро активності DUB. Також каталітичний домен USP1 містить додаткові вставки, які моделюють його

Створення рекомбінантних конструкцій pECFP-C3-USP1-domain-1 та pECFP-C3-USP1-domain-2 як ключових інструментів ...

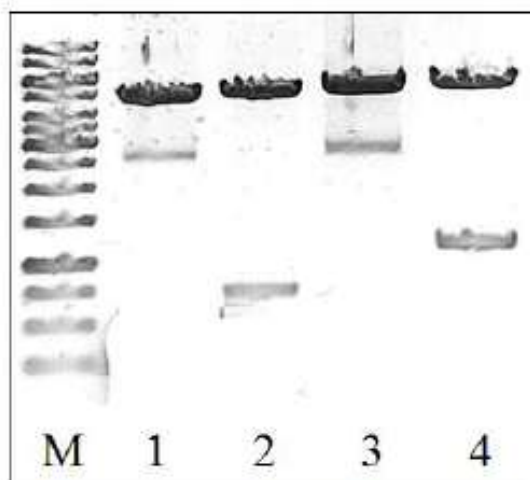


Рис. 3. Електрофореграма, скринінг цільових рекомбінантів: 1 – вектор pECFP-C3, результати рестрикційного картування за сайтами *Sall*, *PstI*; 2 – результати реакції лігування кодуючої послідовності домена 1 гена USP1 у плазмідний вектор pECFP-C3, результати рестрикційного картування pECFP-C3-USP1 за сайтами *Sall*, *PstI*; 3 – вектор pECFP-C3, результати рестрикційного картування за сайтами *EcoRI*; 4 – результати реакції лігування кодуючої послідовності домена 2 гена USP1 у плазмідний вектор pECFP-C3, результати рестрикційного картування pECFP-C3-USP1 за сайтами *EcoRI*. М – маркер молекулярних мас GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

У ході експерименту була створена генетична конструкція USP1-domain-1, яка має цільову послідовність фрагменту гена USP1, що кодує 294 амінокислотних залишків. Конструкція USP1-domain-2 несе кодуючу послідовність домену 2, що має 379 амінокислотних залишків. Структурний склад USP1-domain-1 включає два сайти ядерної локалізації, сигнал ядерного експорту, вставку L1, деградуєчий мотив, а також ділянку, відповідальну за взаємодію з UAF1. У свою чергу, USP1-domain-2 містить два сайти His-боксу (H593 і D751), сайт автокаталітичного розщеплення G670/G671, вставку L2 та аналогічну ділянку, що забезпечує взаємодію з UAF1.

USP1 має ключову роль у регуляції різноманітних клітинних процесів, зокрема, бере участь у підтриманні генетичної стабільності, репарації ДНК, контролює подвоєння центросом, забезпеченні балансу між процесами убиквітування і деубіквітування білків. Порушення у функціонуванні деубіквітинази USP1 може бути однією із причин розвитку та прогресування злоякісних новоутворень [10]. Попередні наші дослідження виявили взаємодію USP1 із онкобілком Bcr-Abl у клітинах ХМЛ. Зокрема показано, що USP1 взаємодіє з Bcr-Abl через дві свої ізоформи, тоді як третя ізоформа до взаємодії не залучена. Також було встановлено здатність впливати на рівень онкобілка Bcr-Abl шля-

хом інгібування рівня деубіквітуючої активності USP1, що створює передумови для розробки нової стратегії терапії захворювання [8], яка буде не чутлива до мутаційної активності кіназного домену та завдяки високій селективності сприятиме протеолізу онкобілка у клітинах ХМЛ.

Розуміння функціональних особливостей доменної організації білка USP1 має важливе значення для визначення їх ролі у локалізації білка, його каталітичній активності та розумінні механізмів утворення білкового комплексу Bcr-Abl/USP1, який на сьогодні детально не вивчений. Ми вважаємо, що в результаті утворення даного білкового комплексу відбувається деубіквітування онкобілка Bcr-Abl за рахунок каталітичної активності USP1, що порушує протеоліз Bcr-Abl, призводить до його накопичення та прогресування захворювання. Таким чином, з'ясування механізмів білкової взаємодії Bcr-Abl і USP1 відкриває нові можливості для моделювання рівня онкобілка за допомогою протеосомної системи деградації та розробки альтернативної стратегії терапії ХМЛ.

Висновки

У результаті проведеного дослідження було змодельовано та успішно створено генетичні конструкції pECFP-C3-USP1-domain-1 та

Матвієнко А. С., Антоненко С. В., Гур'янов Д. С., Телегєєв Г. Д.

pECFP-C3-USP1-domain-2, які кодують ключові домени деубіквітинази USP1. Отриманні вектори будуть використані для вивчення функціональних особливостей доменів білка USP1, їх ролі у локалізації білка та взаємодії із онкобілком Bcr-Abl. Ми вважаємо, що одним із головних наслідків утворення білкового комплексу Bcr-Abl/USP1 є порушення процесу убіквітинуювання онкобілка за рахунок деубіквітинуючої активно-

сті USP1, що призводить до його накопичення в клітині та прогресування захворювання. Таким чином, зв'язування механізмів білкової взаємодії Bcr-Abl і USP1 є важливим для розуміння патогенезу захворювання та розробки нової стратегії терапії ХМЛ, яка сприятиме селективному зниженню рівню онкобілка шляхом інгібування деубіквітинуючої активності USP1.

References

1. Chereda B., Melo J. V. Natural course and biology of CML. *Ann Hematol.* 2015. Vol. 94. P. 107–121. <https://doi.org/10.1007/s00277-015-2325-z>.
2. Kang Z., Liu Y., Xu L., Long Z., Huang D., Yang Y. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin Journal of Cancer.* 2016. <https://doi.org/10.1186/s40880-016-0108-0>.
3. Jabbour E., Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. *American Journal of Hematology.* 2020. Vol. 95. P. 691–709. <https://doi.org/10.1002/ajh.25792>.
4. Bakkar M., Khalil S., Komal B., Kushwaha N. Ubiquitin-Specific Protease Inhibitors for Cancer Therapy: Recent Advances and Future Prospects. *Biomolecules.* 2025. Vol. 15 (2). P. 240. <https://doi.org/10.3390/biom15020240>.
5. Nishchenko D., Antonenko S., Guryanov D., Telegiev G. Features of expression and localization of USP1 in different types of malignant neoplasms. *Experimental factors of organism evolution.* 2024. Vol. 34. P. 88–94. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v34.1622>. [in Ukrainian]
6. Xia Zhang, Peng Peng, Li-Wei Bao Ubiquitin-Specific Protease 1 Promotes Bladder Cancer Progression by Stabilizing c-MYC. *Cells.* 2024. Vol. 13. P. 1798. <https://doi.org/10.3390/cells13211798>.
7. Boyko S. The Role of Deubiquitinating Enzymes in Chromatin Regulation. *FEBS Lett.* 2010. Vol. 585. P. 216–2023. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.10.042>.
8. Antonenko S., Telegiev G. Inhibition of USP1, a new partner of Bcr-Abl, results in decrease of Bcr-Abl level in K562 cells. *Experimental Oncology.* 2023. Vol. 42 (2). P. 109–114. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-2.14533>.
9. UniProt. Retrieved from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/O94782/entry#sequences>.
10. Antonenko S., Zavelevich M., Telegiev G. The role of USP1 deubiquitinase in the pathogenesis and therapy of cancer. *Acta Biochimica Polonica.* 2023. Vol. 70 (2). P. 219–231. https://doi.org/10.18388/abp.2020_6636.
11. Dharadhar S., Dijk W. J., Scheffers S., Fish A., Sixma T. K. Insert L1 is a central hub for allosteric regulation of USP1 activity. *EMBO reports.* 2021. Vol. 22 (4). <https://doi.org/10.15252/embr.202051749>.
12. Liang X.-W., Wang S.-Z., Liu B. A review of deubiquitinases and their roles in tumorigenesis and development. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023. Vol. 11. P. 88–94. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1204472>.

MATVIEIENKO A. S.^{1,2}, ANTONENKO S. V.¹, GUR'YANOV D. S.¹, TELEGEV G. D.¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolomogo str., 150

² Kyiv National University of Technologies and Design, Ukraine, 01011, Kyiv, Mala Shchyvanovska str., 2

GENERATION OF RECOMBINANT CONSTRUCTS pECFP-C3-USP1-DOMAIN-1 AND pECFP-C3-USP1-DOMAIN-2 AS KEY TOOLS FOR STUDYING THE DOMAIN ORGANIZATION OF USP1 AND ITS INTERACTION WITH THE ONCOPROTEIN BCR-ABL

Aim. The aim of this study is to generate recombinant constructs pECFP-C3-USP1-domain-1 and pECFP-C3-USP1-domain-2, essential for investigating the domain organization of the USP1 protein, determining their role in USP1 function, and analyzing their interaction with the oncoprotein Bcr-Abl. **Methods.** Standard molecular cloning techniques were employed, including polymerase chain reaction (PCR), ligation, restriction enzyme digestion, as well as DNA extraction and purification methods. **Results.** The genetic constructs pECFP-C3-USP1-domain-1 and pECFP-C3-USP1-domain-2, encoding key domains of the USP1 protein, were successfully designed and obtained. **Conclusions.** The generated genetic constructs pECFP-C3-USP1-domain-1 and pECFP-C3-USP1-domain-2 will be utilized to study the role of these domains in USP1 function, its subcellular localization, and the formation of the Bcr-Abl/USP1 protein complex. These findings will contribute to a better understanding of the role of USP1 in cellular processes and facilitate the development of novel therapeutic approaches for the treatment of chronic myeloid leukemia (CML).

Keywords: chronic myeloid leukemia (CML), Bcr-Abl oncoprotein, ubiquitin-specific proteases (USPs), USP1, USP1 domains.

ДОДАТОК Б

**National Academy of Sciences of Ukraine
INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS**

**XIX All-Ukrainian Conference
of Young Scientists
May 20-21, 2025**

BOOK OF ABSTRACTS

The conference is dedicated to the Day of Science in Ukraine

Kyiv 2025

**CREATION OF GENETIC CONSTRUCTS pECFP-C3-USP1-DOMAIN-1 AND
pECFP-C3-USP1-DOMAIN-2 FOR ANALYSIS OF THE FUNCTIONAL
ROLE OF USP1 DOMAINS AND THEIR ROLE IN THE FORMATION OF
THE USP1/BCR-ABL PROTEIN COMPLEX IN CHRONIC MYELOID
LEUKEMIA CELLS**

Matvieienko A.S.¹, Antonenko S.V.¹, Guryanov D.S.¹, Telegeev G.D.¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU

matvieienkoayastasia@gmail.com

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disease caused by the formation of the Philadelphia chromosome due to the t(9;22) translocation. This abnormality leads to the formation of the Bcr-Abl oncogene, which encodes a constitutively active tyrosine kinase - a key factor in the pathogenesis of CML. Previous studies have shown that the deubiquitinase USP1 stabilizes the oncoprotein Bcr-Abl, making USP1 a promising therapeutic target. However, the mechanisms of the interaction between Bcr-Abl and USP1 remain poorly understood and are a topic for further research. **Aim.** to create recombinant constructs pECFP-C3-USP1-domain-1 and pECFP-C3-USP1-domain-2 to study the features of the domain organization of the USP1 protein and determine their role in the functioning of the USP1 deubiquitinase and the mechanisms of formation of the Bcr-Abl/USP1 protein complex in CML cells. **Methods.** Recombinant constructs were modeled using the Serial Cloner 2.6.1 program. The coding sequences were amplified by PCR using high-fidelity Pfu polymerase according to the manufacturer's instructions using the following primers, domain 1: Fwd GACGAGCTGTACAAGTACTCAG, Rev attagtcgacATGACTGGTGTTCCTTGGATAAT and domain 2 Fwd gagtcgaccGAAGTTAAACCCATAAACAAGGTG, Rev TCAGTTATCTAGATCCGGTGGA. The amplified sequences were ligated into the pECFP-C3 vector. Screening of target recombinants was performed using specific restriction endonucleases. The correctness of the reading frame and the absence of mutations was confirmed by sequencing. **Results.** Genetic constructs pECFP-C3-USP1-domain-1 and pECFP-C3-USP1-domain-2 were created. The vector pECFP-C3-USP1-domain-1 encodes 294 amino acid residues of domain 1, which includes two nuclear localization sites, a nuclear export signal, an L1 insert that promotes USP1 hyperactivation, and a degradation motif. In turn, pECFP-C3-USP1-domain-2 encodes 379 amino acid residues of domain 2 and has in its structure two His-box sites (H593 and D751) and an autocatalytic cleavage site G670/G671. **Conclusions.** The obtained recombinant constructs pECFP-C3-USP1-domain-1 and pECFP-C3-USP1-domain-2 will be used to study the role of domains in the functioning of the USP1 protein, its subcellular localization and the features of the interaction of the Bcr-Abl and USP1 proteins, which is an important component of understanding the molecular basis of CML pathogenesis and developing new approaches to treating the disease using the proteasomal degradation system.

ДОДАТОК В

**Освітньо-наукові інновації у сфері
біології, збереження здоров'я людини
та психосоціальної і фізичної
реабілітації**

МАТЕРІАЛИ

III Всеукраїнської науково-практичної
інтернет-конференції

15 листопада 2024 р.
РІВНЕ

ОСВІТНІ ТА НАУКОВІ ІННОВАЦІЇ У СФЕРІ БІОЛОГІЇ, ЗБЕРЕЖЕННЯ ЗДОРОВ'Я ЛЮДИНИ ТА ПСИХОСОЦІАЛЬНОЇ І ФІЗИЧНОЇ РЕАБІЛІТАЦІЇ 15.11.2024

Руденко Світлана, Самойлов Євгеній АНАЛІЗ АМІНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ СОЄВИХ БІЛКІВ ТА ЙОГО ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ	69
Солодка Тетяна, Опанасюк Дмитро ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ ТРИХОГРАМИ	73
Сяська Інна, Туринський Денис ОСОБЛИВОСТІ ІСНУВАННЯ КОМАХ НЕКРОБІОНТІВ У ЗЕЛЕНИХ ЗОНАХ МІСТА ШЕПЕТІВКИ	77
Сяський Володимир, Сяська Інна, Сяська Іванна ІНТЕЛЕКТУАЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЕЛЕКТРОКАРДІОГРАМ МЕТОДАМИ МАШИННОГО НАВЧАННЯ	82
Грохимчук Ірина ПЛЮРИПОТЕНТНІСТЬ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ ТА ІСТОРІЯ ЇХ ДОСЛІДЖЕННЯ	87
Грохимчук Ірина, Стецюк Софія ВІРУСНИЙ ЕНЦЕФАЛІТ: ІНФЕКЦІЙНІ ЧИННИКИ	93
Філіппов Михайло, Макеєва Марія ФІЗІОЛОГІЧНІ МЕХАНІЗМИ В ОРГАНІЗМІ СПОРТСМЕНІВ, ЯКІ ЗАЙМАЮТЬСЯ ГІРСЬКИМ ТУРИЗМОМ	98
Хатунцева Світлана, Нікітенко Наталія СУЧАСНІ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ЇХНІ РІЗНОМАНІТНІ ЗАСТОСУВАННЯ В НАУЦІ, МЕДИЦИНІ ТА СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ	105
Янчевський Олександр, Коробко Ігор, Дегтярьов Олег ВИКОРИСТАННЯ СУЧАСНИХ БІОТЕХНОЛОГІЙ У ВИВЧЕННІ КЛІТИННОГО МЕТАБОЛІЗМУ	113
Bobrova Mariia THE EFFECT OF STORAGE TIME ON THE CHANGE IN THE VALUE OF THE PAS INDICATORS IN THE TISSUES OF <i>HELLANTHUS ANNUUS</i> L. SEEDS	118
СЕКЦІЯ 2 СУЧАСНІ ТЕНДЕНЦІЇ РОЗВИТКУ БІОЛОГІЧНОЇ ОСВІТИ У СЕРЕДНІЙ І ВИЩІЙ ШКОЛІ ТА У ПОЗАШКІЛЬНИХ ЗАКЛАДАХ	123
Грецький Ігор, Матвеев Анастасія ЗАСТОСУВАННЯ МОВИ ПРОГРАМУВАННЯ R ДЛЯ ЕФЕКТИВНОГО ВИВЧЕННЯ БІОІНФОРМАТИКИ ТА АНАЛІЗУ БІОЛОГІЧНИХ ДАНИХ	
Грицай Наталія, Полюхович Ірина РЕАЛІЗАЦІЯ КОМПЕТЕНТНІСНОГО ПІДХОДУ НА УРОКАХ БІОЛОГІЇ І ЕКОЛОГІЇ В 10-11 КЛАСАХ	130
Кононюк Дар'я, Альохіна Тетяна ВИКОРИСТАННЯ ІНФОРМАЦІЙНО-КОМУНІКАЦІЙНИХ ТЕХНОЛОГІЙ В ПРОЦЕСІ ФОРМУВАННЯ ПІЗНАВАЛЬНОГО ІНТЕРЕСУ В УЧНІВ ЗАГАЛЬНООСВІТНІХ НАВЧАЛЬНИХ ЗАКЛАДІВ ПРИ ВИВЧЕННІ БІОЛОГІЇ	133

СЕКЦІЯ 2.

СУЧАСНІ ТЕНДЕНЦІЇ РОЗВИТКУ БІОЛОГІЧНОЇ ОСВІТИ У СЕРЕДНІЙ
І ВИЩІЙ ШКОЛІ ТА У ПОЗАШКІЛЬНИХ ЗАКЛАДАХ

Ігор Грецький,

к. б. н., доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра

Київський національний університет технологій та дизайну

Анастасія Матвеевко,

здобувачка вищої освіти ОС «Магістр»,

Київський національний університет технологій та дизайну

ЗАСТОСУВАННЯ МОВИ ПРОГРАМУВАННЯ R ДЛЯ
ЕФЕКТИВНОГО ВИВЧЕННЯ БІОІНФОРМАТИКИ ТА АНАЛІЗУ
БІОЛОГІЧНИХ ДАНИХ

Анотація. Стрімкий розвиток біоінформатики та зростання обсягів біологічних даних підкреслюють важливість використання засобів для їхнього оброблення й аналізу. Одним з можливих інструментів є мова програмування R, оскільки вона забезпечує широкий спектр обчислювальних та графічних можливостей. Особливу увагу привертає пакету Bioconductor, який значно розширює можливості R для аналізу геномних і фенотипових даних. Переваги R як інструмента для біоінформаційного аналізу включають наявність спеціалізованих бібліотек, можливість візуалізації складних даних, ефективне об'єктно-орієнтоване структурування та відкритий код, що робить його доступним для глобальної спільноти науковців. На думку авторів R сприяє розвитку аналітичних навичок студентів для проведення прогресивних досліджень у галузі біології та медицині.

Ключові слова: біоінформатика, мова програмування R, Bioconductor, аналіз біологічних даних, статистичний аналіз, візуалізація.

Актуальність вивчення та застосування біоінформатики стрімко зростає через необхідність аналізувати великі обсяги біологічних даних, що генеруються сучасними технологіями. До цих даних належать послідовності ДНК, РНК, амінокислот, білкові структури, метаболічні профілі, фенотипи й елементи біорізноманіття. Біоінформатика розглядає широкий спектр питань – від зберігання геномних даних і математичного моделювання біологічних послідовностей до вивчення молекулярних механізмів складних захворювань та відстеження еволюційної історії живих організмів. Для студентів цей напрям відкриває доступ до потужних інструментів для обробки та аналізу біологічних даних, що сприяє глибокому розумінню біологічних процесів, розвитку аналітичного мислення та навичок роботи з великими масивами даних. Такі знання є ключовими для вивчення складних біологічних систем і реалізації прогресивних досліджень у сучасній науці [8].

В біоінформатиці застосовують декілька основних сучасних програмних продуктів, які допомагають вирішити проблеми обробки великих кластерів даних, до них належать мови програмування R та Python. Ці мови програмування набули значної популярності в галузі обробки даних завдяки своїм великим бібліотекам і зручним інтерфейсам. Python є більш універсальною мовою програмування, він простий у вивченні, має велику кількість пакетів, але він більш придатний для загальних задач, на цьому фоні R вигідно виділяється, оскільки його використовують саме для специфічних потреб аналізу біологічних даних. R ідеально підходить для статистичного аналізу та візуалізації, завдяки таким пакетам, як 'dplyr' та 'ggplot2'. R має складніший синтаксис, але забезпечує потужні інструменти саме для біологічних і статистичних даних, створюючи високоякісну графіку з легкістю налаштувань, що є вагомою перевагою для дослідників у біоінформатиці [3].

Науковці в останні п'ятнадцять років все частіше почали використовувати цю мову програмування, на це вказують результати певних дослідів, а саме постійне лінійне зростання коефіцієнту використання R в різних дослідженнях. Цей коефіцієнт збільшився з 11,1% у 2008 році до вражаючих 70,6% у 2022 році.

Цей аналіз підкреслює ключову роль R з його потужними можливостями статистичного аналізу та візуалізацією даних для проведення глибокого аналізу та отримання всебічного розуміння різних аспектів науки [5].

Характеристика мови програмування R та Bioconductor. R - це мова програмування та програмне середовище, спеціально розроблене для статистичних обчислень, аналізу даних і їх графічного представлення [5]. R є однією з найбільш гнучких і потужних мов програмування, розробленою спеціально для аналізу даних. Мова R здатна оброблювати велику кількість типів різноманітних об'єктів – вектори, матриці, списки, таблиці з даними тощо. В R можна працювати із великою кількістю типів даних. Це можуть бути, наприклад, числа з дробовою частиною, цілі числа, текстові записи, значення дати та часу, значення логічних операцій та інше. Розміри векторів і матриць можуть змінюватися за бажанням користувача; дані не мають жорсткої структури. Це є дуже корисним при прогнозуванні, особливо якщо користувачу потрібно надати прогноз на довільний термін. R є не просто платформою для написання програм, вона здатна також імпортувати дані з різних джерел інформації, у тому числі й текстові дані, системи управління базами даних, інші статистичні програми і спеціалізовані репозиторії даних.

Крім того, R є досить невеликим за розмірами програмним забезпеченням але графічні можливості дуже розвинуті і набагато кращі за більшість інших статистичних пакетів [1].

R доступне як безкоштовне програмне забезпечення у формі вихідного коду. Воно компілюється та працює на різноманітних платформах UNIX та подібних системах (включаючи FreeBSD та Linux), Windows та MacOS [6]. Наявність безкоштовної платформи з відкритим вихідним кодом робить його доступним для роботи по всьому світу, це дуже зручно для вивчення в навчальних закладах та організаціях, які мають обмежені ресурси, або в країнах, що розвиваються [5].

R має величезну колекцію пакетів, наданих користувачам, доступних у Comprehensive R Archive Network (CRAN) та інших сховищах [5]. У базовий дистрибутив R включений основний набір пакетів, тоді як усього їх чисельність

наближається до 1000. У наш час у світі доступні більше 60 дзеркал CRAN [1]. Дослідники можуть використовувати ці пакети для доступу до спеціалізованих функцій і алгоритмів, розширюючи можливості R для своїх конкретних наукових аналізів. R дозволяє дослідникам проводити складні аналізи, створювати переконливі візуалізації та прозоро ділитися своєю роботою, що робить його найкращою мовою для наукових досліджень та аналізу даних [5].

На основі R було створено проект Bioconductor – це програмне забезпечення для обчислювальної біології та біоінформатики [4]. Bioconductor також є великим сховищем R-пакетів, пов'язаних із біоінформатикою, який на сьогоднішній день налічує 3691 бібліотеку. Проект Bioconductor надає доступ до потужних статистичних і графічних методів для аналізу геномних даних. Пакети аналізу стосуються робочих процесів для аналізу олігонуклеотидних масивів, аналізу послідовностей, проточної цитометрії та інших високопродуктивних геномних даних. Сама система пакетів R забезпечує реалізацію широкого спектру найсучасніших статистичних і графічних методів, включаючи лінійне та нелінійне моделювання, кластерний аналіз, прогнозування, повторну вибірку, аналіз виживання та аналіз часових рядів [2].

Проект Bioconductor надає програмне забезпечення для зв'язування мікрочипів та інших геномних даних у реальному часі з біологічними метаданими з веб-баз даних, таких як GenBank, Entrez genes і PubMed (пакет анотацій). Також передбачені функції для включення результатів статистичного аналізу у звіти HTML із посиланнями на веб-ресурси для анотацій. Програмні інструменти доступні для збирання та обробки даних геномної анотації з таких баз даних, як GenBank, Gene Ontology Consortium, Entrez genes, UniGene, UCSC Human Genome Project (пакет AnnotationDbi). Пакети анотаційних даних поширюються, щоб забезпечити відображення між різними ідентифікаторами зондів (наприклад, ідентифікатори Affy, гени Entrez, PubMed). Також можна зібрати налаштовані бібліотеки анотацій [2].

Проект Bioconductor має відкритий код з розповсюдженням через загальнодоступний сервер Git, що надає цілий рід інструментів, які дозволяють

науковцям досліджувати та розширювати методи, що використовуються для аналізу біологічних даних [2].

Є три основних сховища в Bioconductor: «Програмне забезпечення», що містить аналітичні інструменти, «AnnotationData», що містить бази даних анотацій для мікроматричних зондів, геномних особливостей тощо, і «ExperimentData», що містить різноманітні набори експериментальних даних. ThebiocViews-пакет дозволяє автоматизувати класифікацію, пошук і візуалізація зв'язків метаданих пакетів і залежності з використанням підходу на основі мережевих графів [7].

На сьогоднішній день проект надає такі ресурси: онлайн-сховище для отримання програмного забезпечення, даних і метаданих, документів і навчальних матеріалів; група розробників, яка координує обговорення стратегій програмного забезпечення та розвитку; спільнота користувачів, яка забезпечує тестування програмного забезпечення, пропонує покращення та самодопомогу; більше 80 пакетів програмного забезпечення, сотні пакетів метаданих і ряд експериментальних пакетів даних [4].

Застосовуючи R при вивченні біоінформатики, її можна використовувати для статистичної обробки масивів даних та розрахунків. За допомогою R, наприклад, розв'язують складні завдання математичної статистики, роблять первинний аналіз даних, здійснюють математичне моделювання. В освітніх цілях R часто використовують у поєднанні з інтерфейсом RStudio (також безкоштовне, вільно поширюване програмне забезпечення), який має зручний інтерфейс та безліч додаткових опцій, що значно підвищують продуктивність роботи фахівця.

Застосовуючи R, можна підготувати дані для дослідження і обробки результатів експерименту у різних сферах життя, наприклад, медицині, природокористуванні, охороні довкілля, економетриці й фінансовому аналізі, маркетингу, інженерних розрахунках тощо. R не тільки підтримує широкий спектр статистичних і чисельних методів, а й може бути розширений за допомогою програмних пакетів – бібліотек для роботи специфічних функцій або спеціальних сфер застосування [7].

Мова програмування R та програмне забезпечення Bioconductor відкривають широкі можливості для біоінформаційного аналізу, оскільки дозволяють підібрати пакети та бібліотеки даних для конкретного досліджу, проаналізувати будь-які типи даних та інтерпретувати результати у вигляді зручних зрозумілих графічних схем.

Переваги застосування R у вивченні біоінформатики та аналізу біологічних даних:

1. R як інтерпретована мова високого рівня дозволяє легко прототипувати й швидко реалізовувати нові методи для обробки біологічних даних [7].
2. R надає ефективну об'єктно-орієнтовану структуру, що спрощує вирішення складних біологічних і статистичних задач [2].
3. R має потужні бібліотеки для створення графіків і візуалізації складних біологічних даних, що допомагає в інтерпретації результатів [2, 9].
4. R забезпечує доступ до численних наборів даних для аналізу в біоінформатиці, що дозволяє обробляти й перевіряти різноманітні дані з різних джерел [2].
5. Розвинена широка спільнота користувачів і розробників сприяє швидкому розвитку нових інструментів та освітніх ресурсів [9].
6. R забезпечує можливості відтворення результатів, що є особливо важливим для біологічних досліджень, де відтворюваність даних критична [5].

Таким чином, на нашу думку, одним із найкращих сучасних інструментів у вивченні біоінформатики та аналізі біологічних даних є мова програмування R. Актуальність використання мови програмування R для аналізу біологічних даних обумовлена її спеціалізованими бібліотеками та інструментами, що дозволяють обробляти, аналізувати й візуалізувати складні біологічні дані. R забезпечує студентів можливістю виконувати статистичні розрахунки та моделювання, необхідні для інтерпретації великих наборів біологічних даних. Завдяки широкій спільноті та відкритому коду, R активно розвивається та є доступним інструментом для навчання сучасного дослідника.

Слід зазначити, що мова R має значний потенціал у майбутньому для розвитку біоінформатики завдяки здатності швидко розробляти нові

обчислювальні методи та забезпечувати ефективну візуалізацію складних біологічних даних. Активна спільнота R постійно розширює можливості цієї мови, додаючи інструменти для обробки геномних і клінічних даних, що є критично важливим у дослідженнях персоналізованої медицини. Крім того, R підтримує концепцію відтворюваності, яка стає все більш важливою в контексті стандартизації біоінформатичних досліджень.

Список використаних джерел

1. Кофанов О. Є., Солнцев С. О., Зозульов О. В. Програмування із використанням R у статистичних та маркетингових дослідженнях. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2023. 204 с.
2. Bioconductor. URL: <https://www.bioconductor.org/about/> (date of access: 01.11.2024).
3. Comparative Analysis of Python and R for Data Science: A Multifaceted Examination of Tools Medium. URL: https://medium.com/@cowboy_mimi/comparative-analysis-of-python-and-r-for-data-science-a-multifaceted-examination-of-tools-ff19d12cefla (date of access: 01.11.2024).
4. Gentleman R. C., Carey V. J., Bates D. M. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology*. 2004. Vol. 5, no. 10. P. 80. DOI: 10.1186/gb-2004-5-10-r80 (date of access: 01.11.2024).
5. Lai J. Cui D., Zhu W., Mao L. The Use of R and R Packages in Biodiversity Conservation Research. *Diversity*. 2023. Vol. 15, no. 12. P. 1202.: DOI: 10.3390/d15121202 (date of access: 01.11.2024).
6. R: What is R? R: The R Project for Statistical Computing. URL: <https://www.r-project.org/about.html> (date of access: 01.11.2024).
7. Sepulveda J.L. Using R and Bioconductor in Clinical Genomics and Transcriptomics. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2020. Vol. 22, no. 1. P. 3–20. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2019.08.006 (date of access: 01.11.2024).

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
РІВНЕНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ГУМАНІТАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

СЕРТИФІКАТ

№ 2040/24

Засвідчує, що

Анастасія МАТВЄЄНКО

Взяв (-ла) участь у роботі III Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції

**ОСВІТНЬО-НАУКОВІ ІННОВАЦІЇ У СФЕРІ БІОЛОГІЇ,
ЗБЕРЕЖЕННЯ ЗДОРОВ'Я ЛЮДИНИ ТА ПСИХОСОЦІАЛЬНОЇ І
ФІЗИЧНОЇ РЕАБІЛІТАЦІЇ**

Обсяг – 6 годин (0,2 кредити ECTS)
15 листопада 2024 року

Роман ПАВЕЛКІВ



ДОДАТОК Г

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ПЕДАГОГІЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ОБДАРОВАНОЇ ДИТИНИ НАПН УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ЦЕНТР «МАЛА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ»
КАФЕДРА UNESCO З НАУКОВОЇ ОСВІТИ
УКРАЇНСЬКОГО ДЕРЖАВНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ МИХАЙЛА ДРАГОМАНОВА



МАТЕРІАЛИ

*IV Всеукраїнської науково-практичної
онлайн-конференції*

«ІННОВАЦІЙНІ ПРАКТИКИ НАУКОВОЇ ОСВІТИ»

11–16 грудня 2024 року

Київ
2024

Любченко І. І., Сажієнко А. П., Сіроштан О. П. Інноваційні методики професійного розвитку педагогів і наукових керівників в умовах сучасної освіти: від цифрових технологій до інтерактивного навчання.....	500
Мазнюк Т. Ф. Професійний розвиток педагогів загальноосвітніх навчальних закладів в умовах реформування освіти: сучасні методики та інструментарій.....	509
Макаренко А. В., Яковенко В. Г., Скрипниченко М. А. Інноваційні технології в освітньому процесі студентів фізкультурного профілю.....	518
Макаріна В. Методичний підхід до організації інтегрованих досліджень на прикладі проведеного заходу до дня енергетика	526
Максімов Є. Л. Сучасні технології: використання AI, VR, AR, цифрових платформ для дослідницької діяльності у вивченні іноземних мов	530
Манян Л. В. Культура мовлення. Порушення лексичної та граматичної норм здобувачами освіти під час написання творчих робіт	532
Марухно В. О. Від віртуальної реальності до штучного інтелекту: інновації для дослідницької діяльності.....	536
Матвєєнко А. С., Грецький І. О. Мова програмування R як зручна платформа для планування дослідження та аналізу результатів біологічних експериментів	544
Matviienko L. H. Integration of VR technologies into research activities of students of higher education institutions.....	548
Мацокін Д. В., Пахомова І. М. Віртуальна реальність у вивченні кристалічних структур: інноваційні підходи та можливості	551
Медвідь М. М., Павленко О. І. Інтеграція AI, VR, AR та цифрових платформ у навчання з креслення: інновації та перспективи.....	557
Мельник Є. О. Використання сервісу Mozaik 3D на уроках мистецтва для дослідницької діяльності	560
Мирончук Н. М., Раєць В. В. Використання інноваційних технологій у процесі навчання хімії	562
Мирошніченко Ю. Б., Гранат Р. А. Практичне використання комп'ютерних технологій на уроках фізики. План-конспект уроку: «Ядерна модель атома. Дослід Резерфорда»	569
Міхно С. В. Деякі аспекти впровадження музейної педагогіки в умовах глобалізації та викликів сьогодення.....	578
Мозуль І. В. Учнівські проєкти як інструмент опанування англійською мовою..	587
Моренко О. О. Платформа «Mission X-Train Like an Astronaut» на прикладі місії «Robotic Arm»	590

6. Крюкова Є. Використання імерсивних технологій в освіті/Є. С. Крюкова, Т. П. Голуб, О. С. Америкідзе/ Інноваційна педагогіка. Випуск 32. Т. 2. 2021 [Електронний ресурс]. – Режим доступу до ресурсу: http://www.innovpedagogy.od.ua/archives/2021/32/part_2/39.pdf
7. Шевченко І. Дослідження штучного інтелекту в Україні: здобутки та перспективи. URL: <https://cutt.ly/DwDHeR3M>
8. Augmented and Virtual Reality. Survey Report. March, 2019, VOLUME. – URL: <https://www.perkinscoe.com/images/content/2/1/v4/218679/2019-VR-AR-Survey-Digital-v1.pdf>
9. Bailenson J. N., Yee, N., Blascovich J., Beall A. C., Lundblad N., Jin M.. The use of immersive virtual reality in the Learning Sciences: Digital transformations of teachers, students, and social context. Journal of the Learning Sciences, 17(1), 2008, PP. 102–141. URL: <https://doi.org/10.1080/1050840070179314>
10. UK' first 5G immersive classroom brings richer learning experience to pupils, BT Group. URL: <https://newsroom.bt.com/uks-first-5g-immersive-classroom-brings-richer-learning-experience-to-pupils/>

Матвеєнко А. С.,

*студентка другого (магістерського) рівня вищої освіти
Київський національний університет технологій та дизайну
E-mail: nasmat2003@gmail.com*

Грецький І. О.,

*к.б.н., доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра
Київський національний університет технологій та дизайну
E-mail: ihorhretskyi@gmail.com*

МОВА ПРОГРАМУВАННЯ R ЯК ЗРУЧНА ПЛАТФОРМА ДЛЯ ПЛАНУВАННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА АНАЛІЗУ РЕЗУЛЬТАТІВ БІОЛОГІЧНИХ ЕКСПЕРИМЕНТІВ

Анотація. Мова програмування R є потужною платформою для дослідницької діяльності, яка активно застосовується для планування та аналізу біологічних експериментів. Вона дозволяє здійснювати широкий спектр статистичних і чисельних аналізів, а також візуалізувати дані за допомогою різних графічних методів. Завдяки наявності великої кількості пакетів, доступних через репозиторій CRAN, та інтеграції з іншими мовами програмування, R надає гнучкі інструменти для обробки даних, моделювання та створення відтворюваних досліджень. Особливу увагу варто приділити платформі Bioconductor, яка спеціалізується на обробці та аналізі геномних даних у біоінформатиці. R має величезний потенціал для розвитку в галузі персоналізованої медицини завдяки своїй здатності швидко адаптуватися до нових технологій і наукових викликів.

Ключові слова: мова програмування R, біоінформатика, CRAN, Bioconductor, геномні дані, статистичний аналіз, візуалізація даних.

Abstract. The R programming language is a powerful platform for research activities, widely used for the planning and analysis of biological experiments. It allows performing a wide range of statistical and numerical analyses, as well as visualizing data using various graphic methods. With a vast number of packages available through the CRAN repository and integration with other programming languages, R provides flexible tools for data processing, modeling, and creating reproducible research. Special attention should be given to the Bioconductor platform, which specializes in the processing and analysis of genomic data in bioinformatics. R has immense potential for development in the field of personalized medicine due to its ability to rapidly adapt to new technologies and scientific challenges.

Keywords: R programming language, bioinformatics, CRAN, Bioconductor, statistical analysis, data visualization.

Наука та технології не стоять на місці, з появою нових ідей, дослідів, експериментальних даних все актуальнішими стають технології, які допомагають аналізувати та впроваджувати в життя результати дослідницької діяльності. Однією із зручних, популярних та безкоштовних дослідницьких платформ для науковців є мова програмування R, яка допомагає аналізувати та візуалізувати дані за допомогою широкого спектру статистичних і чисельних методів в таких галузях, як: статистика, біоінформатика, математика, біологія, екологія, медицина, природокористування, охорона довкілля, економіка, маркетинг, соціальні науки, машинне навчання, інженерія та багатьох інших [1].

R - це мова програмування та програмне середовище, спеціально розроблене для статистичних обчислень, аналізу даних і їх графічного представлення [2]. Мова R здатна оброблювати велику кількість типів різноманітних об'єктів – вектори, матриці, списки, таблиці з даними тощо. Вона підтримує числові, текстові, логічні дані, а також значення дати й часу [1]. Крім того, R може імпортувати будь-які формати даних з різних джерел: текстових файлів, баз даних і репозиторіїв, що робить її універсальною для дослідницьких завдань [3].

R можна використовувати для виконання різних статистичних аналізів, таких як описова статистика, математичне моделювання, первинний аналіз даних, перевірка гіпотез, кореляція, регресія, кластеризація, класифікація тощо [4; 5]. Також R застосовують при проведенні контролю якості, фільтрації, нормалізації та перетворення даних, а також для обробки відсутніх значень, викидів і помилок [4].

R можна використовувати для побудови та оцінки різних типів моделей, таких як лінійні, нелінійні та змішані моделі, щоб пояснити та передбачити зв'язки між змінними та результатами.

Крім того, R може застосовувати різні методи машинного навчання та штучного інтелекту, такі як нейронні мережі, дерева рішень, метод опорних

векторів тощо, для виконання завдань класифікації, регресії, кластеризації та зменшення розмірності даних.

Інтерпретація та передача даних: R можна використовувати для створення та передачі інформації та результатів аналізу даних, моделювання та прогнозування за допомогою різних інструментів і форматів, таких як звіти, презентації, інформаційні панелі, веб-додатки тощо. R також можна використовувати для відтворення дослідження шляхом документування та обміну кодом, даними та результатами аналізу, використовуючи такі інструменти, як R Markdown, Shiny, GitHub тощо [4].

Також до важливих переваг цієї мови програмування можна віднести наступне: велика та активна спільнота користувачів, що сприяє розробці та розвитку пакетів і бібліотек для різноманітних завдань; R сумісна з іншими мовами програмування та підтримує інтеграцію з Python, C, C++, Perl та іншими мовами, що дозволяє поєднувати R з різними робочими процесами; в R є можливість створення власних функцій, скриптів і пакетів [4].

Однією з головних переваг R є її потужні графічні можливості, які дозволяють візуалізувати дані та представляти їх в інтерактивний спосіб [1].

R має величезну колекцію пакетів, доступних у Comprehensive R Archive Network (CRAN) [2]. CRAN це основний репозиторій для зберігання, розповсюдження та підтримки пакетів мови програмування R. CRAN забезпечує централізоване місце для завантаження понад 20 000 пакетів, що охоплюють широкий спектр завдань, від статистичного аналізу до машинного навчання та біоінформатики. Пакети CRAN проходять ретельну перевірку, що забезпечує їх сумісність і стабільність. Розробники можуть завантажувати свої пакети, а користувачі легко встановлювати їх через команду `install.packages()` в R.

CRAN містить експериментальні конструкції загального призначення, які включають методи планування та аналізу експериментів, що застосовуються в різних галузях науки та техніки. Вони включають такі конструкції, як повністю випадкові, рандомізовані блокові та факторні плани. Основна мета цих конструкцій визначити вплив одного або декількох факторів на результативну змінну, мінімізуючи похибки та забезпечуючи ефективне використання ресурсів.

Також CRAN містить експериментальні конструкції для комп'ютерних експериментів, вони орієнтовані на моделювання та оптимізацію комп'ютерних симуляцій, де фізичні експерименти замінюються обчислювальними моделями. Вони включають методи, такі як латинські гіперкуби, методи кригінгу (Kriging), та дисперсійне моделювання (Design and Analysis of Computer Experiments, DACE). Основна мета – отримати точні оцінки вихідних даних симуляції при мінімальній кількості запусків моделі [6].

На основі мови програмування R було розроблено проект Bioconductor для планування та аналізу біологічних експериментів, зокрема в галузі обчислювальної біології та біоінформатики [7]. Це програмне забезпечення пропонує потужні статистичні та графічні методи для аналізу геномних даних, включаючи аналіз олігонуклеотидних масивів, білкових послідовностей і проточної цитометрії. Наразі платформа містить понад 3690 пакетів, орієнтованих на різні завдання біоінформатики [8].

Bioconductor підтримує інтеграцію з базами даних, такими як GenBank, Entrez genes і PubMed, що забезпечує зв'язок між геномними даними та біологічними метаданими в реальному часі. Пакети проекту дозволяють отримувати дані з таких ресурсів, як Gene Ontology Consortium та UCSC Human Genome Project, забезпечуючи анотацію геномних даних та відображення між різними ідентифікаторами, зокрема Affymetrix і Entrez [8].

R та платформа Bioconductor пропонують спеціалізовані пакети для обробки геномних даних і візуалізації біологічних результатів. Це дозволяє дослідникам проводити відтворювані дослідження та наочно представляти свої результати [8].

Слід зазначити, що мова R має значний потенціал у майбутньому для розвитку біоінформатики завдяки здатності швидко розробляти нові обчислювальні методи та забезпечувати ефективну візуалізацію складних біологічних даних. Активна спільнота R постійно розширює можливості цієї мови, додаючи інструменти для обробки геномних і клінічних даних, що є критично важливим у дослідженнях персоналізованої медицини. Крім того, R підтримує концепцію відтворюваності, яка стає все більш важливою в контексті стандартизації біоінформатичних досліджень [1].

Таким чином, можна підвести підсумки, що сьогоденні наукові проблеми та виклики потребують сучасних технологічних рішень, саме тому все частіше науковці в своїй дослідницькій діяльності для оцінки та візуалізації отриманих результатів використовують мову програмування R.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Кофанов О. Є., Солнцев С. О., Зозульов О. В. Програмування із використанням R у статистичних та маркетингових дослідженнях. Київ : КІП ім. Ігоря Сікорського, 2023. 204 с.
2. Lai J. Cui D., Zhu W., Mao L. The Use of R and R Packages in Biodiversity Conservation Research. *Diversity*. 2023. Vol. 15, no. 12. P. 1202.: DOI: 10.3390/d15121202 (date of access: 03.12.2024).
3. Wickham H. *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. New York : Springer, 2016. 260 p.
4. R for Bioinformatics. URL: https://medium.com/@this_is_madhan/r-for-bioinformatics-347841a00b8f (date of access: 03.12.2024).
5. Sepulveda J.L. Using R and Bioconductor in Clinical Genomics and Transcriptomics. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2020. Vol. 22, no. 1. P. 3–20. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2019.08.006 (date of access: 03.12.2024).

6. CRAN: Comprehensive R Archive Network. URL: <https://cran.r-project.org> (date of access: 03.12.2024).
7. Gentleman R. C., Carey V. J., Bates D. M. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology*. 2004. Vol. 5, no. 10. P. 80. DOI: 10.1186/gb-2004-5-10-r80 (date of access: 03.12.2024).
8. Bioconductor. URL: <https://www.bioconductor.org/about/> (date of access: 03.12.2024).

Matviienko L. H.,

Ph. in Pedagogy,

Associate professor of the department of Germanic and Ukrainian philology,

Poltava State Agrarian University,

lgdziuba@ukr.net

INTEGRATION OF VR TECHNOLOGIES INTO RESEARCH ACTIVITIES OF STUDENTS OF HIGHER EDUCATION INSTITUTIONS

Анотація. У статті розглядається потенціал використання VR-технологій у дослідницькій діяльності студентів філологічних спеціальностей. Зазначено, що віртуальна реальність відкриває нові можливості для вивчення текстів, мовних явищ та культурних контекстів, дозволяючи моделювати комунікативні ситуації, реконструювати історичні середовища та створювати інтерактивні віртуальні архіви. Визначено основні напрями застосування VR-технологій у філології, зокрема моделювання культурно-історичних контекстів, аналіз літературного простору та візуалізація мовних структур. Акцент зроблено на інноваційному потенціалі технологій для розширення традиційних методів філологічних досліджень.

Ключові слова: віртуальна реальність, VR-технології, філологія, дослідницька діяльність, цифрові технології, культурно-історичний контекст, моделювання мовних структур.

Abstract. The article discusses the potential of using VR technologies in the research activities of students of philological specialties. It is noted that virtual reality opens up new opportunities for the study of texts, linguistic phenomena and cultural contexts, allowing to model communicative situations, reconstruct historical environments and create interactive virtual archives. The main areas of application of VR technologies in philology are identified, including modelling of cultural and historical contexts, analysis of literary space and visualisation of linguistic structures. The emphasis is placed on the innovative potential of technologies for expanding traditional methods of philological research.

Keywords: virtual reality, VR technologies, philology, research, digital technologies, cultural and historical context, modelling of language structures.

The modern world requires students of higher education institutions to have not only fundamental knowledge but also the ability to apply innovative technologies in

ДОДАТОК Д



**XVI Всеукраїнська науково-практична
конференція для молодих учених та
здобувачів освіти**

«СУЧАСНІ ІНФОРМАЦІЙНІ ТЕХНОЛОГІЇ В ОСВІТІ І НАУЦІ»



**Збірник
матеріалів**

УМАНЬ – 2025

КРАВЧЕНКО Д. В., ДЕКАРЧУК М. В. Гейміфікація як інструмент підвищення інтересу до вивчення фізики в ЗЗСО.....	129
КУБЕНКО В. О. Основні аспекти використання технологій дистанційного навчання учнів природничих дисциплін в ЗЗСО.....	132
КУЛЕНКОВА Г. В. Використання інформаційно-комунікаційних технологій під час розв'язування алгебраїчних виразів.....	135
ЛЕНЧУК А. С. Стереотипізація образу співрозмовника у діловій комунікації.....	138
ЛІФАНОВА Т. В. Цифрові технології навчання у ЗЗСО.....	142
МАЛЦЬКИЙ М. Д. Гейміфікація сучасного освітнього середовища із використанням платформи Blooket.....	145
МАЛЦЬКИЙ М. Д. Застосування Unity на уроках інформатики для освоєння програмування та розробки інтерактивних проєктів.....	147
МАЛЦЬКИЙ М. Д. Переваги та виклики використання Linux замість Windows в освітньому процесі.....	150
МАТВЄЄНКО А. С. Можливості дизайну біотехнологічних експериментів у середовищі R.....	152
МАХНО Є. П., СУДНІКОВ Є. О., КОМІНКО В. Д. Розвиток електронного навчання в Збройних Силах України: ефективність використання імітаційних систем у підготовці військових фахівців.....	155
МЕДВЕДЄВА М. О., ЛУЖЕНЕЦЬКИЙ А. І. Методика навчання розробці мобільних застосунків з використанням платформи App Inventor та Thunkable.....	158
МЕДВЕДЄВА М. О., НОСЕНКО А. О. Цифрові інструменти для активізації пізнавальної діяльності здобувачів освіти на уроках інформатики в старших класах.....	161
МЕДВЕДЄВА М. О., ПАВЛІК А. В. Використання інтерактивних методів та цифрових інструментів для розвитку логічного мислення здобувачів освіти на уроках інформатики.....	165
МЕДВЕДЄВА М. О., ТАРАК Р. Р. Моделювання ймовірнісних процесів та статистичних експериментів за допомогою програмного забезпечення: нові горизонти в освіті.....	169
МЕДВЕДЄВА М. О., СТАРЧЕНКО А. В. Ігрові технології як інструмент формування алгоритмічного мислення в учнівській молоді.....	172
МЕДВЕДЄВА М. О., КРИЖАНОВСЬКИЙ В. В. Мобільні застосунки для використання в освітньому процесі.....	175
МЕДВЕДЄВА М. О., ЯРОВИЙ В. В. Інтерактивні інструменти для роботи на уроках інформатики.....	178
МЕЛЕНЕЦЬ Н. М. Реалізація інтегрованого підходу на уроках математики засобами ІКТ.....	181
МЕЛЬНИЧЕНКО М. О. Використання цифрових інструментів для подолання освітніх втрат з математики.....	185
МЕНЬКОВ І. С. Особливості впровадження цифрових технологій в освітній процес.....	187
МІХРЯКОВА Я. Г. Медіаграмотність в освіті: від зародження поняття до сучасності.....	189

стратегічного планування, методичної адаптації програм навчання та належного технічного супроводу для максимізації переваг та мінімізації потенційних недоліків.

Список використаних джерел

1. Давиденко О. С. Використання ОС Linux в навчальному процесі. *FOSS Lviv 2014*, м. Львів, 24–27 квіт. 2014 р. Львів, 2014. С. 29–32 (дата звернення: 22.03.2025).
2. Kong M., Li J., Wang Fengming. Study on educational mode of Linux majors in colleges. *2010 international conference on artificial intelligence and education*, м. Hangzhou, China, 29–30 October 2010. URL: <https://doi.org/10.1109/icaie.2010.5641146> (дата звернення: 22.03.2025).
3. Enterprise Open Source and Linux | Ubuntu. *Ubuntu*. URL: <https://ubuntu.com/> (дата звернення: 22.03.2025).

МАТВЄЄНКО А. С.

студентка 1 курсу другого (магістерського) рівня вищої освіти факультету хімічних і біофармацевтичних технологій

Науковий керівник: Грецький І. О.

*кандидат біологічних наук, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра
Київський національний університет технологій та дизайну*

МОЖЛИВОСТІ ДИЗАЙНУ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ЕКСПЕРИМЕНТІВ У СЕРЕДОВИЩІ R

У сучасних біотехнологічних дослідженнях експериментальні методи відіграють ключову роль у розробці нових продуктів та оптимізації біопроцесів, що потребує значних ресурсів та вимагає планування та аналізу даних. Одним із ефективних підходів до оптимізації експериментальних досліджень є застосування методів планування експериментів (Design of Experiments, DoE), що дозволяє підвищити точність результатів, мінімізувати витрати ресурсів і оптимізувати процес прийняття рішень.

Мова програмування R є потужним інструментом для реалізації методів DoE завдяки широкому вибору пакетів і функцій для статистичного аналізу. Вона забезпечує дослідників гнучкими можливостями моделювання, візуалізації даних та автоматизації експериментального процесу. Наявність в R таких спеціалізованих пакетів, як DoE.base та AlgDesign надає широкі можливості для створення, аналізу та візуалізації експериментальних схем, що робить R цінним ресурсом для біотехнологів у наукових і навчальних цілях.

Пакет DoE.base в R є фундаментальним інструментом для створення, аналізу та управління експериментальними проектами. Він забезпечує інфраструктуру для роботи з дизайнами експериментів, включаючи повні факторіальні та ортогональні масиви. Завдяки своїй гнучкості, він підходить як для професійних статистиків, так і для користувачів без глибоких знань у цій галузі [1].

Основна функціональність DoE.base націлена на створення повних факторіальних експериментів, генерацію експериментів на основі ортогональних масивів, включаючи нерегулярні ортогональні масиви та оцінку якості експериментальних дизайнів за різними критеріями.

DoE.base містить декілька основних функцій, наприклад такі як: `fac.design` для створення повних факторіальних проектів, `oa.design` для роботи з ортогональними масивами та функції візуалізації та аналізу, такі як `plot.design` та `summary.design`.

Основні переваги DoE.base є: забезпечення комплексних рішень для створення експериментальних проектів, інтеграція з іншими спеціалізованими пакетами для розширення можливостей, пропонує зручний і універсальний інструментарій для користувачів різного рівня кваліфікації, а також підходить для стандартних та нестандартних експериментів [2].

Пакет AlgDesign в R використовується для створення оптимальних експериментальних дизайнів, які дозволяють максимально ефективно оцінювати вплив різних факторів на результати дослідження. Основна мета пакета -

допомогти дослідникам створити такі дизайни, які мінімізують кількість експериментів, зберігаючи при цьому точність отриманих даних.

Основними можливості пакета AlgDesign є: створення оптимальних дизайнів, а саме підтримує D-оптимальні, A-оптимальні та інші критерії для розробки експериментів, мінімізує кількість необхідних комбінацій факторів для досягнення бажаної точності. Робота з дискретними і неперервними факторами дає можливість створення дизайнів як для дискретних (категорійних), так і для неперервних факторів. Застосування у багатофакторних експериментах дає можливість планування дизайнів для аналізу взаємодій між багатьма факторами. AlgDesign дає можливість ефективно управляти ресурсами, що дозволяє знизити витрати на проведення експериментів, зменшуючи кількість необхідних спостережень.

Основними функціями пакета AlgDesign є: `optFederov()`, який надає можливість створення D-оптимального дизайну на основі критерію Федерова, `gen.factorial()` використовується для генерації повнофакторних дизайнів, `optBlock()` дає можливість створювати блокові дизайн, `eval.design()` використовується для оцінки ефективності дизайну.

До основних переваг пакета AlgDesign можна віднести: ефективність створення дизайнів, які мінімізують витрати часу та ресурсів, гнучкість цього пакета дозволяє підтримувати різні критеріїв оптимізації для задоволення різних потреб дослідження. Підтримка складних експериментів дає можливість роботи з багатофакторними моделями і взаємодіями.

Сферами застосування цього пакета можуть бути хімічна, біологічна, біотехнологічна, механічна та інші інженерні галузі в яких є необхідність оптимізації процесу. В фармацевтичній галузі цей пакет розкриває можливість мінімізації кількості клінічних випробувань із забезпеченням високої точності. В сфері сільського господарства пакет AlgDesign дозволяє планувати експерименти для тестування нових методів обробки культур [3].

Таким чином, дизайн експериментів (DoE) є потужним інструментом для оптимізації біотехнологічних досліджень, що дозволяє підвищити ефективність

експериментальних процесів, мінімізувати використання ресурсів і покращити якість отриманих даних. Застосування цих методів у навчанні біотехнологів сприяє розвитку аналітичного мислення, навичок статистичного аналізу та роботи з великими обсягами даних. Крім того, інтеграція R в освітній процес дозволяє майбутнім фахівцям отримати практичний досвід планування експериментів і вдосконалити свої компетенції у сфері цифрових технологій.

Список використаних джерел

1. DoE.base: Full Factorials, Orthogonal Arrays and Base Utilities for DoE Packages. URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/DoE.base/index.html> (date of access: 26.03.2025).
2. Grömping U. R Package DoE.Base for Factorial Experiment. Journal of Statistical Software, vol. 85, no. 5, June 2018, pp. 1-41, doi:10.18637/jss.v085.i05.
3. AlgDesign: Algorithmic Experimental Design. URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/AlgDesign/index.html> (date of access: 26.03.2025).

МАХНО Є. П.

*доктор філософії, начальник наукової-дослідної лабораторії наукового
центру дистанційного навчання*

СУДНІКОВ Є. О.

старший науковий співробітник наукового центру дистанційного

КОМІНКО В. Д.

науковий співробітник наукового центру дистанційного навчання

Національний університет оборони України

**РОЗВИТОК ЕЛЕКТРОННОГО НАВЧАННЯ В ЗБРОЙНИХ СИЛАХ
УКРАЇНИ: ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ ІМІТАЦІЙНИХ
СИСТЕМ У ПІДГОТОВЦІ ВІЙСЬКОВИХ ФАХІВЦІВ**

Одним із джерел інформації та освіти сьогодні є електронне освітнє середовище (ЕОС), яке є складною та багаторівневою системою, що поєднує методичні, організаційно-технологічні ресурси та інтелектуальний потенціал програмного забезпечення і навчальних закладів, що реалізуються під час взаємодії учасників освітнього та інформаційного процесів. Включення систем

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
УМАНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ПАВЛА ТИЧИНИ
ІНСТИТУТ ЦИФРОВІЗАЦІЇ ОСВІТИ НАПІВ УКРАЇНИ
УКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ МИХАЙЛА ДРАГОМАНОВА
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВОЛОДИМИРА ГНАТЮКА
ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ «ЖИТОМИРСЬКА ПОЛІТЕХНІКА»

СЕРТИФІКАТ

ЗАСВІДЧУЄ УЧАСТЬ

Анастасії Матвєєнко

у XVI Всеукраїнській науково-практичній конференції для молодих учених та здобувачів освіти
«Сучасні інформаційні технології в освіті і науці»

10–11 квітня 2025 року

15 годин (0,5 кредиту ECTS)

Проректор з наукової роботи,
доктор педагогічних наук, професор



Тетяна ГОДОВАНЮК

ДОДАТОК Е



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ КІБЕРПОРТ
КАФЕДРА АВТОМАТИЗАЦІЇ ТА КОМП'ЮТЕРНО-ІНТЕГРОВАНИХ ТЕХНОЛОГІЙ



ЗБІРНИК МАТЕРІАЛІВ

МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ
ЗДОБУВАЧІВ ВИЩОЇ ОСВІТИ І МОЛОДИХ УЧЕНИХ

**«ІНФОРМАЦІЙНІ ТЕХНОЛОГІЇ
В СУЧАСНОМУ СВІТІ»**

29 квітня 2025 р.
м. Харків

Зміст

Bulanova N.M., Kanivets B.V., Tarasenko A.E. <i>National University «Yuri Kondratyuk Poltava Polytechnic»</i> ANALYSIS OF MODELS OF ORGANIZATION OF INFORMATION PROCESSES IN ARCHITECTURE AND CONSTRUCTION	321
Чалий І.В., Міхальова К.М. <i>Державний біотехнологічний університет</i> ОГЛЯД БЕЗКОШТОВНИХ ОНЛАЙН-КУРСІВ ВІД ПОРТАЛУ PROMETHEUS ДЛЯ ПІДГОТОВКИ ФАХІВЦІВ З КІБЕРБЕЗПЕКИ	322
Малій О.Г., Орел Д.О. <i>Державний біотехнологічний університет</i> ОЦІНКА КРЕДИТОСПРОМОЖНОСТІ ПІДПРИЄМСТВ-ПОЗИЧАЛЬНИКІВ БАНКАМИ В УКРАЇНІ: СУЧАСНІ ПІДХОДИ ТА ПРАКТИКИ	325
Матвєєнко А.С., Грецький І.О. <i>Київський національний університет технологій та дизайну</i> МЕТААНАЛІЗ БІОЛОГІЧНИХ ДАНИХ ЗА ДОПОМОГОЮ ІНСТРУМЕНТІВ МОВИ ПРОГРАМУВАННЯ R	328
Шалай Ю.Т., Качурак Ю.М. <i>Національний університет «Львівська політехніка»</i> РОЗРОБКА КОНЦЕПЦІЇ СМАРТ-СИСТЕМИ ДЛЯ МОНІТОРИНГУ ПАРАМЕТРІВ ТА ДОСТУПУ ДО ПРИМІЩЕННЯ НА ОСНОВІ STM-32	331
Бабан Т.О., Буялова О.О., Герасимчук Я.І. <i>Державний біотехнологічний університет</i> ЦИФРОВІЗАЦІЯ СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА ДЛЯ СТАЛОГО РОЗВИТКУ	334
Хоміч Є.С., Нечитайло Ю.А. <i>Державний біотехнологічний університет</i> КЛІЄНТ-СЕРВЕРНИЙ ДОДАТОК ДЛЯ ОПТИМІЗАЦІЇ РОБОТИ МАГАЗИНУ ОРГТЕХНІКИ	337
Проценко Н.М., Свинарьова Д.С. <i>Державний біотехнологічний університет</i> ТЕХНОЛОГІЇ ЗАХИСТУ ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСТНОСТІ В ОНЛАЙН-СЕРЕДОВИЩІ	339
Балашов Г.С., Нечитайло Ю.А. <i>Державний біотехнологічний університет</i> СИСТЕМИ АВТОМАТИЗОВАНОГО КЕРУВАННЯ ПЕРЕРОБКОЮ ВТОРИННОЇ СИРОВИНИ	342

Секція 4. Інформаційні технології для сталого розвитку

УДК 303.642.052

**МЕТААНАЛІЗ БІОЛОГІЧНИХ ДАНИХ ЗА ДОПОМОГОЮ
ІНСТРУМЕНТІВ МОВИ ПРОГРАМУВАННЯ R**

Грецький І.О., к.біол.н., доц.

Матвеєнко А.С., здобувач РВО магістр

Київський національний університет технологій та дизайну

м. Київ, Україна, ihorhretskyi@gmail.com

Анотація. Біотехнологія є ключовою галуззю для досягнення сталого розвитку, оскільки забезпечує створення ефективних біотехнологічних процесів, виробництво біопродуктів і біоенергії, а також впровадження екологічних технологій. Успішне впровадження біотехнологічних рішень потребує системного узагальнення значних обсягів наукових даних, які отримані за різних умов і методологій. Метааналіз, як потужний статистичний інструмент, дозволяє об'єднувати результати незалежних досліджень, знижуючи вплив випадкових похибок і підвищуючи надійність висновків. У цьому контексті метадані відіграють центральну роль, забезпечуючи структуровану інформацію про параметри досліджень, методи розрахунків та додаткові модераторні змінні. Мова програмування R є оптимальним середовищем для проведення метааналізу завдяки своїй гнучкості, прозорості аналітичних процедур і широкому спектру доступних інструментів. Особливо слід відзначити пакет *metafor*, який забезпечує розрахунок розмірів ефекту, адаптацію моделей до різних типів даних, оцінку гетерогенності та упередженості, а також візуалізацію результатів. Поєднання методів метааналізу та інструментів R сприяє систематизації біологічних даних, виявленню загальних закономірностей і забезпеченню прийняття обґрунтованих рішень у галузі біотехнологій, що є важливим у контексті сталого розвитку.

Ключові слова: метааналіз біологічних даних, метадані, мова програмування R, пакет *metafor*, сталий розвиток, статистичний аналіз

Біотехнологія є ключовою сферою для сприяння сталому розвитку, зокрема через створення ефективних біотехнологічних процесів, виробництво біопродуктів і біоенергії, а також запровадження технологій для очищення довкілля. Проте для успішного впровадження біотехнологічних рішень потрібне системне узагальнення великого обсягу наукових даних, отриманих за різних умов і з використанням різноманітних методологій.

Метааналіз виступає потужним статистичним інструментом, який дозволяє об'єднувати результати незалежних досліджень, знижуючи вплив випадкових похибок та підвищуючи надійність висновків. Цей підхід сприяє виявленню загальних закономірностей і оцінці довгострокової ефективності біотехнологічних підходів, що має важливе значення для прийняття рішень у контексті сталого розвитку [1].

У процесі метааналізу особливу роль відіграють метадані – структурована інформація про дослідницькі дані, яка описує їх джерела, властивості та методи обробки. Метадані охоплюють характеристики досліджень (вибірку, дизайн), параметри та методи розрахунків (розмір ефекту, інтервали довіри, моделі аналізу), а також додаткові дані, такі як упередженість публікацій або модератори.

Мова програмування R забезпечує широкий спектр інструментів для проведення метааналізу, включаючи пакети для обробки метаданих, моделювання та візуалізації результатів. Серед них одним із найбільш популярних є пакет *metafor*, який дозволяє проводити гнучкий аналіз, включаючи метарегресію, оцінку гетерогенності та чутливості. Завдяки високій відтворюваності, прозорості аналітичних процедур та великій кількості доступних пакетів, R є оптимальним інструментом для аналізу біологічних даних у контексті сталого розвитку [2, 3].

Пакет *metafor* – це потужний інструмент для метааналізу, що забезпечує широкий спектр методів і функцій. Він дозволяє проводити статистичний аналіз із використанням моделей фіксованих, випадкових і змішаних ефектів, а також виконує додаткові діагностичні та графічні операції. До основних функцій пакета *metafor* можна віднести наступні.

Розрахунок розмірів ефекту та їх трансформація: функція *escalc()* дозволяє розраховувати розміри ефекту, включаючи стандартизовані середні різниці, коефіцієнти ризику, співвідношення шансів, кореляції, пропорції тощо. Трансформації даних для відповідності вимогам моделі (наприклад, *r-to-z*, логарифмічні або квадратні корені).

Аналіз за моделями: функція *rma()* підтримує моделі фіксованих, випадкових і змішаних ефектів. Функція *rma.mv()* забезпечує багаторівневий і багатоваріантний аналіз. Підтримка мережевого та філогенетичного метааналізу.

Візуалізація даних: лісові діаграми (*forest()*), воронкові графіки (*funnel()*), радіальні графіки (*radial()*), діаграми Баужа (*baujat()*). Інтерактивна графічна діагностика, що полегшує інтерпретацію даних.

Перевірка упередженості: тест рангової кореляції (*ranktest()*), перспективний тест Еггера (*regtest()*), обрізання та заповнення (*trimfill()*).

Діагностика та аналіз впливу: функції для виявлення викидів та впливових досліджень (*influence()*, *leave1out()*), оцінка моделей за допомогою критеріїв AIC, BIC (*AIC()*, *BIC()*).

Сумісність: підтримка інтеграції з іншими пакетами, такими як *glmulti*, *MuMIn*, *mice* [4].

Перевагами пакета *metafor* для проведення метааналізу є гнучкість, оскільки цей пакет забезпечує можливість адаптації моделей до різних типів даних і дизайнів досліджень. Пакет дозволяє візуалізувати дані, а саме створювати інформативні графіки для аналізу та презентації результатів. Також *metafor* є сумісним із іншими пакетами та доступним для інтеграції нових функцій.

Однак, на ряду з вагомими перевагами цей пакет має декілька суттєвих недоліків, а саме: складність, оскільки вимагає від користувача глибокого розуміння статистики та мови програмування R. Для великих моделей, таких як багаторівневий аналіз, можуть знадобитися значні затрати часу. Людям, які не мають базових знань в цій галузі може бути складно розібратися з великою кількістю функцій і параметрів.

Секція 4. Інформаційні технології для сталого розвитку

При використанні пакету *metafor* рекомендується проводити попередню діагностику даних для забезпечення їх відповідності обраним моделям. Важливо використовувати методи перевірки упередженості для уникнення неправильних інтерпретацій, оскільки ефективність роботи пакета залежить від якості даних і правильної трансформації змінних [5].

Метааналіз є універсальним статистичним підходом, що дозволяє узагальнювати результати численних досліджень, підвищуючи надійність висновків та зменшуючи вплив випадкових похибок. У сфері біотехнології він сприяє виявленню загальних закономірностей, оцінці ефективності технологій і прийняттю науково обґрунтованих рішень у контексті сталого розвитку.

Мова програмування R, завдяки своїй гнучкості, широкому спектру пакетів і інструментів, зокрема пакету *metafor*, є оптимальним середовищем для проведення метааналізу. Вона забезпечує інтеграцію даних, адаптацію моделей до специфіки досліджень та наочну візуалізацію результатів.

Таким чином, використання інструментів R у поєднанні з методами метааналізу дозволяє науковцям ефективно обробляти великі обсяги біологічних даних, сприяючи прогресу у біотехнологіях та досягненню цілей сталого розвитку.

Список літератури

1. Harrer M., Cuijpers P., Furukawa T., Ebert D. D. *Doing Meta-Analysis with R: A Hands-On Guide*. Publisher: CRC Press/Chapman & Hall. vol. 1, September 2021. DOI: [10.1201/9781003107347](https://doi.org/10.1201/9781003107347)
2. Nakagawa, S., Santos, E. S. Methodological issues and advances in biological meta-analysis. *Evolutionary Ecology*, vol. 26(5). February 2012. P.1253-1274. DOI: [10.1007/s10682-012-9555-5](https://doi.org/10.1007/s10682-012-9555-5)
3. The metafor Package: A Meta-Analysis Package for R. URL: <https://www.metafor-project.org/doku.php/metafor> (date of access: 11.04.2025).
4. The metafor Package: A Meta-Analysis Package for R. Package Features. URL: <https://www.metafor-project.org/doku.php/features> (date of access: 11.04.2025).
5. Balduzzi, S., Rücker, G., Schwarzer, G. How to perform a meta-analysis with R: a practical tutorial. *Evid Based Ment Health*, vol. 22(4), 2019. p. 153-160. DOI: [10.1136/ebmental-2019-300117](https://doi.org/10.1136/ebmental-2019-300117)

ДОДАТОК Ж

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ



Державний біотехнологічний університет

Технологічний
університет Лулео,
Швеція

Університет
аграрних наук,
Швеція

Природничий
дослідницький
центр, Литва

Рейн-Ваальський
університет
прикладних наук,
Німеччина

Рейн-Ваальський
університет
прикладних наук,
Німеччина

КО «Харківський
зоопарк»

Миколаївський
національний
аграрний
університет

Харківський
національний
університет ім.
В.М. Каразіна

Інститут
сільського
господарства
карпатського
регіону НААНУ

**АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ,
ЕКОЛОГІЇ ТА ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ****МАТЕРІАЛИ МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВОЇ КОНФЕРЕНЦІЇ**

14-15 травня 2025 р.

Харків
ДБТУ
2025

Шевкунов О.В. АНАЛІЗ ДОСЛІДЖЕНЬ НАУКОВЦІВ З ВИВЧЕННЯ *LUMBRICULUS VARIEGATUS* ЯК ПОВНОЦІННОГО КОРМУ ДЛЯ РИБИ 330

Шаблій Д.О. ВПЛИВ ІОНІЗОВАНОГО АМІАКУ НА ТЕМПИ ЗРОСТАННЯ МОЛОДІ АФРИКАНСЬКОГО СОМА (*CLARIAS GARIEPINUS*) В УЗВ 331

Безносок А.М. ГЕМАТОЛОГІЧНІ ПАРАМЕТРИ КРОВІ СВИНЕЙ ПРИ АЛЬТЕРНАТИВНОМУ БІЛКОВОМУ ЖИВЛЕННІ 332

Разанова О.П., Скрипник С.В. РОЛЬ СТИМУЛЮЮЧИХ ПІДГОДІВЕЛЬ У ПІДВИЩЕННІ ПРОДУКТИВНОСТІ БДЖОЛИНИХ СІМЕЙ 334

Колісник О.І., Прудніков В.Г., Дидикіна А.І., Боднарчук І.М. МОДЕЛЮВАННЯ ПІДХОДІВ У ВИРОБНИЦТВІ ЯЛОВИЧИНИ 335

Секція 4. ІСТОРІЯ БІОТЕХНОЛОГІЙ, ЕКОЛОГІЙ Й АКВАКУЛЬТУРИ. ТЕОРІЯ ТА ПРАКТИКА ПІДГОТОВКИ ФАХІВЦІВ ІЗ БІОТЕХНОЛОГІЙ, ПРИРОДНИЧИХ І АГРАРНИХ НАУК 337

Безуглий М.Д., Щербак О.В. КЛОНУВАННЯ ССАВЦІВ: ШЛЯХ ВІД ПІОНЕРСЬКИХ РОБІТ ДО КОМЕРЦІЙНОГО ВИКОРИСТАННЯ 337

Царенок Б.М., Прилупька С.В. ВПЛИВ ОКСИДУ ГРАФЕНУ НА РІСТ ЯЧМЕНЮ ОЗИМОГО ЗА УМОВ ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ 339

Кручина В.В., Берешко І.М., Клевська В.Л. СУЧАСНІ ВИМОГИ ДО ПІДГОТОВКИ ФАХІВЦІВ-ЕКОЛОГІВ 340

Ільїна М.В. МІЖНАРОДНА СПІВПРАЦЯ У СФЕРІ ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ ЯК ПРЕДМЕТ ВИКЛАДАННЯ У ВИЩІЙ ШКОЛІ 342

Матвєєнко А.С., Грепський І.О. МОВА ПРОГРАМУВАННЯ R ЯК ПЛАТФОРМА ДЛЯ МАШИННОГО НАВЧАННЯ І АНАЛІЗУ ДАНИХ БІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ 344

Шелахова Ю.О., Масюк О.М. ФОРМУВАННЯ ЕКОЛОГІЧНОЇ СВІДОМОСТІ У МАЙБУТНІХ ФАХІВЦІВ ПРИРОДНИЧИХ НАУК: ДОСВІД ДАНІЇ ТА НІДЕРЛАНДІВ .. 346

Швець О.Г. ІНТЕГРАЦІЯ МІЖДИСЦИПЛІНАРНИХ ЗНАЇНЬ У ПІДГОТОВЦІ ФАХІВЦІВ З БІОТЕХНОЛОГІЙ: ПЕДАГОГІЧНІ СТРАТЕГІЇ ТА МЕТОДИЧНІ РІШЕННЯ 348

Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування, 2025.

«Екологічна безпека», що з одного боку є виправданим, а з іншого боку свідчить про суттєве обмеження вітчизняними науковцями та практиками розуміння економіки природокористування як галузі знань, одним із предметом дослідження якої і є власне екологічна безпека.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1 Ніколаєв, Ю., Андреева, Є. // Сучасні проблеми економіки природокористування. 2021. 47-49.

2 Ільїна М. // Educere et Educare. 2024. 19 (49): 25-44. Режим доступу: <https://e-revista.unioeste.br/index.php/educereeteducare/article/view/32873> (дата доступу: 04.05.2025).

МОВА ПРОГРАМУВАННЯ R ЯК ПЛАТФОРМА ДЛЯ МАШИННОГО НАВЧАННЯ І АНАЛІЗУ ДАНИХ БІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

А.С. Матвієнко¹, І.О. Греський²

Київський національний університет технологій та дизайну, м. Київ, Україна,

¹студентка 1 курсу другого (магістерського) рівня вищої освіти,

matvieienkoavastasia@gmail.com

²кандидат біологічних наук, доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра,

ihorhretskvi@gmail.com

Вивчення біоінформатики залишається серйозним викликом для студентів біологічних спеціальностей попри всю значущість аналізу біологічних даних. Причини цієї складності пов'язані з міждисциплінарною природою біоінформатики. Для ефективного опанування аналізу даних студент повинен одночасно володіти знаннями в галузі молекулярної біології, базовими принципами програмування, методами статистичного аналізу, а також навичками роботи з базами даних. Для студентів-біотехнологів особливо складними є питання алгоритмічного мислення та логіки програмування, оскільки ці компетенції традиційно не займають центрального місця в навчальних програмах. У цьому контексті інтеграція методів машинного навчання (ML) в освітній процес, пов'язаний з аналізом біологічних даних, відкриває нові можливості для гнучкого, адаптивного та ефективного навчання, надаючи інструменти для автоматизованого аналізу, класифікації та прогнозування.

Однією з популярних платформ для реалізації ML-алгоритмів є мова програмування R, яка спочатку розроблялася для статистичного аналізу, а сьогодні активно використовується як у наукових дослідженнях, так і в освіті. R поєднує багатий набір статистичних методів, бібліотек для ML і забезпечує зручне середовище для аналізу та візуалізації біологічних даних. Серед бібліотек R, що охоплюють широкий спектр методів машинного навчання, користувачі завдяки таким пакетам, як *caret*, *mlr3* та іншим можуть реалізовувати повний цикл моделювання: підготовку даних, побудову моделей, їх валідацію та інтерпретацію результатів. Особливою перевагою є інтеграція ML-інструментів із функціями статистичного аналізу, візуалізації (*ggplot2*), а також доступом до біологічних баз даних через спеціалізовані пакети *Bioconductor*.

Для реалізації методів ML у середовищі R особливе місце займає пакет *caret* (Classification and Regression Training), який створений для спрощення процесу побудови моделей машинного навчання. Основні функціональні можливості пакета включають: попередню обробку даних (нормалізація, імітація відсутніх значень, вибір ключових змінних через методи оцінки важливості), побудову моделей з використанням широкого спектра алгоритмів (понад 200 моделей), автоматизацію процесу пошуку оптимальних гіперпараметрів за допомогою перехресної перевірки [1].

Актуальні питання біотехнології, екології та природокористування, 2025.

Серед основних функцій пакета `caret` слід виокремити наступні:

- `preProcess()` - виконує попередню обробку даних, включаючи нормалізацію, масштабування та імпутацію пропущених значень.
- `train()` - є основною у побудові моделей, підтримує широкий вибір алгоритмів класифікації та регресії.
- `trainControl()` - забезпечує налаштування перехресної перевірки, контроль за процесом навчання моделей.
- `varImp()` - оцінює важливість змінних для побудованої моделі.
- `confusionMatrix()` - генерує матрицю помилок для оцінки продуктивності класифікаційних моделей.
- `resamples()` - дозволяє аналізувати результати перехресної перевірки для різних моделей.

Головними перевагами пакету є: простота інтеграції та використання завдяки єдиному інтерфейсу для різних моделей, потужний набір інструментів для попередньої обробки та великий вибір алгоритмів. Однак, `caret` має декілька суттєвих недоліків, це - обмежена масштабованість для великих наборів даних та нездатність підтримувати сучасні методи глибокого навчання [1].

Пакет `mlr3` є сучасною платформою для машинного навчання, розробленим з акцентом на гнучкість, модульність та продуктивність. Основні особливості пакету включають: зручний дизайн, який дозволяє інтеграцію нових моделей і методів, підтримку паралельних обчислень для прискорення обробки та вбудовані засоби для автоматизації експериментів, включаючи обробку відсутніх значень, пошук гіперпараметрів та оцінку моделей. Пакет `mlr3` має багато різних функцій, однак, найбільш вживаними є:

- `Task()` - визначає структуру даних та тип завдання (класифікація, регресія тощо).
- `Learner()` - інкапсулює алгоритм навчання, містить інформацію про параметри та функціонал моделі.
- `Resampling()` - реалізує стратегії перехресної перевірки, розбиття даних на навчальні та тестові набори.
- `Benchmark()` - дозволяє порівнювати продуктивність кількох моделей або алгоритмів.
- `Autotuner()` - автоматизує пошук оптимальних гіперпараметрів для моделей.
- `PipeOp()` - використовується для побудови складних конвеєрів обробки даних.
- `Measure()` - містить метрики для оцінки продуктивності моделей, такі як RMSE, AUC, F1-score.

Перевагами пакету є: 1) висока продуктивність та масштабованість, оскільки є інструменти для розширеного аналізу та візуалізації моделей; 2) сучасний дизайн з підтримкою багатьох новітніх алгоритмів та методів; 3) добре документована структура та активна підтримка спільноти [2].

Стосовно недоліків пакету `mlr3` варто зазначити, що існує відносна складність для початківців через багатошаровий дизайн та деякі обмеження у підтримці окремих менш поширених алгоритмів.

Вибір програмного пакету залежить від характеру аналітичного завдання. У випадках, коли необхідно реалізувати базові алгоритми машинного навчання, зокрема дерева рішень, метод опорних векторів або логістичну регресію, доцільним є використання пакету `caret`, який забезпечує зручний і стандартизований інтерфейс для моделювання. Натомість для більш складних задач, що потребують високої обчислювальної ефективності, роботи з великими наборами даних, застосування складних моделей і можливостей масштабування, доцільно обрати пакет `mlr3`. Зокрема, `mlr3` надає розширені функції для автоматизації експериментів, багатокритеріальної оцінки моделей та інтеграції з паралельними обчисленнями, що робить його ефективним інструментом у контексті великомасштабного аналізу.

Пакети caret та mlr3 забезпечують широкий спектр інструментів для побудови, налаштування та оцінювання моделей машинного навчання у середовищі R. Вибір між ними визначається специфікою поставленого завдання, доступними обчислювальними ресурсами та рівнем підготовки дослідника щодо відповідного інструментарію. У деяких випадках комбіноване використання обох пакетів може бути доцільним, оскільки дозволяє поєднати простоту реалізації базових моделей (caret) із гнучкістю та масштабованістю, яку пропонує mlr3.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kuhn M. // Journal of Statistical Software. 2008. 28(5): 1–26.
2. Lang M., et al. // Journal of Open Source Software. 2019. 4(44): 1903.

ФОРМУВАННЯ ЕКОЛОГІЧНОЇ СВІДОМОСТІ У МАЙБУТНІХ ФАХІВЦІВ ПРИРОДНИЧИХ НАУК: ДОСВІД ДАНІЇ ТА НІДЕРЛАНДІВ

Ю.О. Шелахова¹, О.М. Масюк²

^{1,2} Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпро, Україна,
студенти бакалавру кафедри біорізноманіття та екології, shelaughsl0@gmail.com

Екологічні проблеми, з якими стикаються сучасні суспільства, є одними з найважливіших викликів для всього людства. Підвищення рівня забруднення навколишнього середовища, зміни клімату та деградація природних ресурсів вимагають серйозного реагування, зокрема через освіту. Одним із важливих напрямків є екологічне виховання, яке має на меті формування в учнів усвідомленого ставлення до природи, розвитку навичок відповідального використання природних ресурсів та участі у збереженні довкілля. Важливою є адаптація міжнародного досвіду в екологічному вихованні для покращення системи освіти в Україні, зокрема в контексті підготовки фахівців природничих наук.

Метою екологічного виховання є формування екологічної свідомості серед учнів, а також розвиток практичних навичок для вирішення екологічних проблем. Важливою складовою є інтеграція екологічних тем у навчальні програми, що дозволяє глибше зрозуміти взаємозв'язок між людиною та природою, а також сприяє підготовці осіб, здатних брати участь у розв'язанні екологічних викликів.

Данія та Нідерланди мають свої специфічні підходи до екологічного виховання, які враховують національні проблеми та ресурси, а також міжнародні стандарти.

Основними забруднювачами повітря в Данії є дрібнодисперсні частки, діоксид азоту та озон, що мають серйозний вплив на здоров'я людини. За останні 125 років температура в країні підвищилася на 1,2°C, що спричинило інтенсивні опади, підвищення рівня моря та зміни екосистем. Використання добрив і пестицидів у сільському господарстві призводить до забруднення ґрунтів і водоносних горизонтів.

Однією з важливих віх у розвитку екологічної освіти в Данії є включення екологічних проблем до змісту професійних освітніх програм для педагогів. Це забезпечує формування екологічної свідомості серед майбутніх учителів. Крім того, велике значення надається самоосвіті педагогів і міждисциплінарній підготовці, що дозволяє покращити розуміння екологічних процесів та їх впливу на різні сфери життя.

Міжнародна та національна співпраця Данії зі скандинавськими країнами включає екологічні проекти, такі як: «Освіта в галузі навколишнього середовища в Скандинавії»; «Балтійське море»; «Північне море»; «Північний симпозіум»; «Чисті річки»; «Кислотні дощі»; «Зелений прапор».