

PROJECT CARD
SUPPORTED BY THE RUSSIAN SCIENTIFIC FOUNDATION

The information has been prepared on the basis of data from the Information and Analytical System of the Russian Science Foundation, the content is presented in the author's edition. All rights belong to the authors, use or reprinting of materials is permissible only with the prior consent of the authors.

GENERAL INFORMATION

Number: 16-14-00048

Title: Antimicrobial and antitumor peptides of insect-saprophages: biosynthesis from renewable raw materials, structural and functional characteristics, prospects for application in medicine.

Head: Sergey Ivanovich Chernysh, Doctor of Biological Sciences

Organization of financing, region: Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "St. Petersburg State University", St. Petersburg

Years of implementation with the support of the Russian Science Foundation: 2016 - 2018

Competition: Competition 2015 "Conducting fundamental scientific research and exploratory research in priority thematic areas of research" (11)

Field of knowledge, main classifier code: 04 - Biology and life sciences, 04-209 - Biotechnology (including bionanotechnology)

Keywords: organic waste, green biotechnology, medical biotechnology, insects, Calliphoridae, biologically active substances, antimicrobial peptides, immunomodulators, biomedicine, veterinary medicine

GRNTI code: 62.13.35

Status: Closed ahead of schedule

INFORMATION FROM THE APPLICATION

Abstract The :

processing of organic waste is one of the most acute environmental and economic problems in the food industry. In solving this problem, biotechnology and bioengineering play a key role, using living systems to accelerate the biodegradation of waste and obtain useful products. In particular, technologies for processing manure by a culture of the housefly *Musca domestica* and food waste by larvae of flies of the family Stratiomyidae are known. A common disadvantage of these technologies is the relatively low added value of the products obtained (zoo compost and larval biomass used for forage purposes), which limits the further development of these technologies.

The proposed project is aimed at creating a biotechnology for obtaining biologically active substances produced by the larvae of saprophagous insects, using waste from the food industry as a raw material. The project is based on the results of the authors' research, which showed that the larvae of the meatfly *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae), cultivated on meat and fish processing waste, are a natural "biofactory" of biologically active substances: antibacterial peptides (defensins, cecropins, dipterocins, proline rich peptides, antiviral peptides alloferons, immunotropic peptides). The use of these biologically active peptides is especially promising in the treatment of antibiotic-resistant bacterial infections. Alloferons and other

immunotropic peptides are promising for the treatment of viral infections and oncological diseases. The listed biologically active compounds, first described by the authors of the project, are new to science and have no close analogs among existing medicinal substances.

The tasks of the project include:

- development of a technology adapted for the production of biologically active substances for medical and veterinary purposes for the mass cultivation of insect-saprophages on waste from the meat and fish industry (*C. vicina* and other members of the Calliphoridae family)
- creation and maintenance of a collection of producer species
- development of in situ biosynthesis technology, isolation and purification of a complex of biologically active peptides from the biomass of producer insects
- application of cell technology for biosynthesis of target products in the primary culture of cells of the adipose body of producer species
- completion of studies of the chemical structure and biological activity of the components of the resulting complex of antimicrobial peptides
- search for new biologically active compounds synthesized by insect producers using molecular biology and proteomics methods (transcriptomic analysis, identification of structural and functional analogs among known antimicrobial and immunotropic proteins and peptides).
- identification of receptors of the obtained peptides in the human immune system and prediction of their possible pharmacological action (computer modeling of ligand-receptor interaction)
- determination of promising areas of application of the products obtained in medicine and veterinary medicine based on the analysis of specific pharmacological activity and toxicological characteristics, molecular modeling, bioinformatics.

The relevance and scientific novelty of the project is due to the following circumstances. The project makes it possible to use as a eukaryotic "biofactory" a group of producers of biologically active substances, new for biotechnology and bioengineering - saprophagous insects of the Calliphoridae family (key problem P9-3-2). The proposed biotechnology makes it possible to produce new biologically active substances for use in medicine and veterinary medicine (the key problem is P9-4-2). The possibility of producing a complex of antimicrobial peptides intended for the treatment of antibiotic-resistant bacterial infections is especially relevant. The complex represents a new type of antibacterial agent that has no close analogues among existing antimicrobial drugs. According to WHO and other international and national organizations, the creation and introduction of such drugs into medicine is the most urgent problem in modern pharmaceuticals. The planned large-scale study of the structural diversity of proteins and peptides synthesized by *C. vicina* and other producer species will undoubtedly expand the list of biologically active products of this biotechnology. Elucidation of the mechanism of action of *C. vicina* immunotropic peptides will make it possible to create on their basis immunomodulators of a new type for the treatment of viral and oncological diseases in humans and animals. The raw material for the proposed technology is waste from the meat and fish industries, and the main end product is biologically active substances with high added value (the key problem is P9-2-3).

Ожидаемые результаты:

1) Будет разработана принципиально новая технология получения в эукариотических системах биологически активных пептидов перспективных для использования в медицине и ветеринарии (ключевая проблема П9-4-2). В качестве видов-продуцентов будут использованы личинки насекомых семейства Calliphoridae (основной вариант – *Calliphora vicina*, дополнительные варианты – другие виды родов *Calliphora*, *Lucilia*). Сырьем для культивирования личинок служат отходы и малоценные побочные продукты мясной и рыбной промышленности, а конечными продуктами – лекарственные вещества с высокой добавленной стоимостью (ключевая проблема П9-2-3). Технология обеспечивает параллельный синтез большого количества биологически активных пептидов, включая соединения сложной структуры (дефензины, гликопротеины из группы диптерицинов и др) при минимальных затратах.

2) В рамках данной биотехнологии предполагается разработать и реализовать два варианта биосинтеза целевых продуктов:

А) Биосинтез *in situ*. В этом варианте источником целевых продуктов (антимикробных и других биологически активных пептидов) служит гемолимфа иммунизированных личинок. В качестве метода промышленного получения биологически активных веществ из насекомых биосинтез *in situ* впервые предложен авторами проекта и соответствует приоритетам ключевой проблемы П9-3-2.

В) Биосинтез *in vitro*. В этом случае биосинтез осуществляется в первичной культуре клеток жирового тела закончивших фазу роста личинок. В этот период жировое тело достигает половины

массы тела личинок и содержит резервы пластических и энергетических веществ для длительного автономного существования клеток. При культивировании в минимальной питательной среде клетки активно синтезируют и выделяют комплекс антимикробных пептидов. Данный вариант клеточной биотехнологии обладает мировым уровнем новизны и соответствует приоритетам ключевой проблемы П9-1-2.

3) Будет выполнен транскриптомный анализ первичной структуры всех пептидных соединений, синтезируемых по предлагаемой технологии, что позволит дополнить список уже установленных соединений (дефензины, диптерицины, цекропины, пролин-богатые пептиды, аллофероны) новыми продуктами параллельного синтеза

4) Будут определены перспективные направления использования получаемых антимикробных соединений в лечении бактериальных инфекций с учетом данных по спектру антибактериальной активности, эффективности в отношении резистентных к антибиотикам штаммов и бактериальных биопленок, токсикологических характеристик

5) Будут определены перспективные направления использования получаемых иммуностропных соединений в лечении вирусных и онкологических заболеваний на основании данных по механизму лиганд-рецепторного взаимодействия с ключевыми рецепторами клеток иммунной системы человека.

ОТЧЁТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Аннотация результатов, полученных в 2016 году:

Разработан и апробирован пилотный вариант технологии переработки отходов птицефабрик культурами насекомых-сапрофагов семейства Calliphoridae (мясных мух), включающий полный цикл операций (поддержание маточной культуры насекомых, подготовка отходов к переработке, выращивание биомассы личинок, отделение личинок от переработанной среды, индукция биосинтеза, выделение, очистка и контроль качества целевых продуктов). В задачу технологии входит получение целевых продуктов с высокой добавленной стоимостью, а именно пептидов и белков медицинского применения. Основными целевыми продуктами технологии на данном этапе являются антимикробные пептиды, цитокиноподобные пептиды из группы аллоферонов, белки из группы арилфорфинов. В дальнейшем список целевых продуктов планируется расширить за счет других биологически активных пептидов личинок, а также генно-инженерных белков человека и других животных. Оптимальным видом отходов является куриная кровь. Для переработки свежая кровь смешивается с инертным наполнителем (древесными опилками) и заселяется личинками I-II возраста. Цикл переработки отходов занимает около 5 суток, после чего зрелые личинки покидают питательную среду. В результате получается биомасса живых личинок и переработанный ими пищевой субстрат. Биомасса используется для извлечения целевых продуктов биологического синтеза из гемолимфы личинок, остатки биомассы могут использоваться в качестве источника кормового белка и жиров. Переработанные отходы могут быть использованы в качестве готового к употреблению органического удобрения. Таким образом, технология является полностью безотходной, не требует использования каких-либо дополнительных химических веществ или высокотемпературной обработки отходов. Все процессы проходят при комнатной температуре. Экспериментально установлено, что для переработки отходов по предлагаемой технологии могут использоваться личинки *Calliphora vicina*, *C. vomitoria*, *Lucilia sericata*. Культуры этих видов поддерживаются в лаборатории и доступны для промышленного использования. На данном этапе реализации проекта базовым методом является биосинтез *in situ* иммунизированными личинками *C. vicina* комплекса антимикробных пептидов. Этот вариант технологии апробирован в серии из 16 независимых экспериментов. Во всех экспериментах получены образцы комплекса с заданными характеристиками антимикробной активности. Титр дефензинов (*M. luteus* тест) в серии опытов варьировал в пределах 3%, суммарный титр анти-грамотрицательных пептидов (*E. coli* тест) в пределах 5% средних значений. Таким образом, разработанная технология обеспечивает получение целевого продукта с заданными свойствами и минимальным уровнем варьирования.

Состав антимикробных пептидов полученного комплекса изучен с использованием комбинации методов хроматографии, массспектрометрии, транскриптомного анализа и биотестирования

антибактериальной активности. В результате установлены полные сиквенсы представителей четырех семейств антимикробных пептидов *C. vicina*: дефензинов, цекропинов, диптерицинов и пролин-богатых пептидов. Детально изучена антимикробная активность комплекса в отношении планктонных и биопленочных форм патогенов человека. Особо следует отметить результаты, полученные на резистентных к антибиотикам биопленкам кишечной палочки *E. coli*, *Staphylococcus aureus* и *Acinetobacter baumannii*. Эти формы бактериальных инфекций относятся к числу наиболее трудноизлечимых и требующих срочного поиска новых лекарственных веществ. Препараты этого типа крайне востребованы в медицине и могут найти применение при лечении широко распространенных резистентных к антибиотикам заболеваний: раневых инфекций, язв, гнойных инфекций кожи, урогенитальных инфекций, инфекций полости рта и дыхательных путей. Кроме того, из гемолимфы личинок *C. vicina* выделен, очищен от примесей и охарактеризован белок арилфорин с молекулярной массой 500 килодальтон, состоящий из 7 субъединиц массой 70 килодальтон каждая. Белок относится к классу гемоцианинов, известному по литературным данным своими противоопухолевыми и иммуномодулирующими свойствами. Этот белок может найти применение в медицине и биотехнологии, аналогичное белку KLN (keyhole limpet hemocyanin), ключевому компоненту для производства вакцинных препаратов (конъюгированных вакцин). KLN получают из природного сырья – одного из видов морских моллюсков, обитающих только в Калифорнии (США). В России отсутствует сырьевая база для производства вакцин на основе KLN, которые в массовом порядке разрабатываются и внедряются в медицину в США для лечения и профилактики рака и вирусных инфекций. Предлагаемая технология позволяет производить аналог KLN, не уступающий ему по качеству, но значительно более дешевый и с гарантированной доступностью.

Создана база матричных РНК *C. vicina*, которая содержит информацию о полном спектре белков и пептидов, синтезируемых личинками в период иммунного ответа (№ SUB2063450, GenBank TSA название “*Calliphora vicina* Transcriptome”). Установлены сиквенсы более 500 пептидов четырех классов (дефензинов, цекропинов, диптерицинов и пролин-богатых пептидов). Установлена также структура ключевых доменов белка арилфорина. В перспективе база данных обеспечит быстрое установление структуры других целевых продуктов, которые могут получаться при помощи предлагаемой технологии.

Среди продуктов, синтезируемых личинками *C. vicina*, нами ранее были обнаружено семейство иммуномодулирующих пептидов – аллоферонов. Синтетические аллофероны в настоящее время используются в качестве противовирусных лекарственных средств. Предлагаемая технология позволяет получать их методом биосинтеза, параллельно с другими продуктами. Проведенные исследования позволили уточнить механизм действия аллоферонов на клетки иммунной системы человека и показали, что аллофероны (применяемые отдельно или в составе получаемого из личинок комплекса пептидов, помимо известного применения для лечения вирусных инфекций, могут найти применение в качестве противоопухолевого препарата.

Публикации:

1. Гордя Н.А., Несин А.П., Симоненко Н.П., Черныш С.И. **Regulation of antimicrobial peptide synthesis in larvae of *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae): a dose-dependent effect of ecdysteroids** Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology, Vol. 52, No. 4, pp. 292—298 (год публикации - 2016).
2. Гордя Н.А., Яковлева А.Ю., Кругликова А.А., Тулин Д.В., Потолицина Е.А., Суборова Т.Н., Розано К., Бордо Д., Черныш С.И. **Naturally occurring antimicrobial peptides in the fighting of antibiotic resistant biofilms** PLOS ONE, - (год публикации - 2016).
3. Яковлев А.Ю., Несин А.П., Симоненко Н.П., Гордя Н.А., Тулин Д.В., Кругликова А.А., Черныш С.И. **Fat body and hemocyte contribution to the antimicrobial peptide synthesis in *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera: Calliphoridae) larvae** In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal, - (год публикации - 2016).

Аннотация результатов, полученных в 2017 году:

Основной целью проекта является создание биотехнологии комплексной переработки органических

отходов пищевой промышленности с целью получения продуктов с высокой добавленной стоимостью, а именно биологически активных веществ, продуцируемых личинками насекомых-сапрофагов. На предыдущем этапе реализации проекта разработан базовый вариант технологии, в котором в качестве продуцента биологически активных веществ используется синяя мясная муха *Calliphora vicina* (семейство Calliphoridae), а сырьем для переработки служит кровь кур. Годовое производство крови кур составляет порядка 4.5 миллионов тонн, а ее утилизация представляет значительные технические и экономические трудности. Основным способом утилизации крови в настоящее время служит технология рендеринга – термической сушки, обеззараживания и превращения в кормовой продукт – кровяную муку. Технология рендеринга представляет крайне энергозатратный процесс, экономическая эффективность которого ограничена относительно низкой себестоимостью конечного продукта. Реализация настоящего проекта позволяет заменить технологию рендеринга на биологический процесс, используемый в природных экосистемах – утилизацию органических отходов личинками мух-сапрофагов. Этот процесс обеспечивает быструю биодegradацию отходов и получение двух видов продуктов – биомассы личинок и органического удобрения (зоокомпоста). Как и в случае рендеринга, основным ограничением биологической переработки является проблема экономической эффективности. В настоящем проекте впервые предлагается решение этой проблемы – использование личинок в качестве эукариотической системы для производства продуктов тонкого биологического синтеза. Предлагаемое решение позволяет получать известные продукты переработки отходов (белковые кормовые добавки и органические удобрения), но дополняет новыми продуктами с высокой добавленной стоимостью. На данном этапе реализации проекта наиболее перспективной группой таких продуктов представляются антимикробные пептиды, продуцируемые иммунокомпетентными клетками личинок в процессе иммунного ответа. Химическая структура, биологические свойства и методы управления биосинтезом антимикробных пептидов изучены авторами в серии многолетних исследований, лежащих в основе настоящего проекта.

В отчетный период одной из задач проекта была разработка методов и средств масштабирования технологии получения комплекса антимикробных пептидов. Прежде всего, следовало решить две технические проблемы – массовой иммунизации (индукции синтеза антимикробных пептидов) и выделения из биомассы личинок гемолимфы, содержащей комплекс антимикробных пептидов. Эту задачу удалось решить, создав методы и устройства для введения иммуногена и сепарации гемолимфы. Найденные решения доступны дальнейшему масштабированию в процессе перехода к технологии промышленного уровня.

Следующей задачей проекта в отчетный период было дальнейшее изучение комплекса антимикробных пептидов *C. vicina* как кандидата в лекарственные вещества, предназначенные для лечения резистентных к антибиотикам форм бактериальных инфекций. Созданная база мРНК личинок *C. vicina*, находящихся в состоянии иммунного ответа на бактериальную инфекцию, позволила уточнить структуру активных компонентов комплекса (антимикробных пептидов из семейств дефензинов, диптерицинов, цекропинов и пролин-богатых пептидов). При помощи комбинации методов хромато-масспектрометрии и биологического тестирования установлено, что основным фактором разрушения биопленок грамположительных бактерий являются дефензины, а грамотрицательных бактерий – диптерицины.

Экспериментально доказана высокая антимикробная активность комплекса в отношении бактериальных биопленок, образуемых наиболее распространенными патогенами человека *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*. Биопленки служат причиной примерно 80% бактериальных инфекций человека, ряда форм рака и сердечно-сосудистых заболеваний. Большинство биопленок отличаются природной устойчивостью к антибиотикам. Установлено, что антибиопленочное действие комплекса направлено на уничтожение клеток-персистеров и разрушение матрикса биопленки, то есть нейтрализует два основных механизма устойчивости биопленок к антибиотикам. Показано, что комплекс нетоксичен для клеток человека и позволяет снизить терапевтически эффективную концентрацию большинства изученных антибиотиков до клинически достижимого уровня, необходимого для эффективного лечения биопленочных инфекций. Таким образом, комплекс антимикробных пептидов *C. vicina* может быть использован для лечения биопленочных инфекций самостоятельно или в качестве адъюванта (синергиста) антибиотиков. Создание подобных адъювантов считается одним из перспективных направлений повышения эффективности антибиотиков. В настоящее время эта ниша в медицине и ветеринарии остается практически незаполненной.

В состав комплекса входит не менее 15 антимикробных пептидов четырех семейств, отличающихся сложной пространственной организацией (дефензины), посттрансляционной модификацией

(диптерицины). Производство такого сложного комплекса (и даже его отдельных компонентов) методами химического или генно-инженерного синтеза практически невозможно с технической и экономической точек зрения и не имеет прецедентов. Предлагаемая технология эту задачу технически разрешимой и экономически целесообразной.

Возможности предлагаемой биотехнологии не ограничиваются получением комплекса антимикробных пептидов. В частности, в отчетный период освоен метод получения и очистки одного из ключевых элементов комплекса – дефензина. В настоящее время на рынке присутствуют дефензины человека и некоторых других организмов, получаемые методами генной инженерии и используемые в научных исследованиях. Предлагаемая технология позволяет получать природный дефензин с более низкой себестоимостью и перспективой применения в качестве научного реактива и лекарственного препарата (например, для лечения стафилококковых инфекций). Параллельно из биомассы личинок можно получать и другие биологически активные белки и пептиды. Исследования в этом направлении планируется продолжить на третьем этапе реализации проекта.

Информация о проекте в Интернет-ресурсах:

Исследование иммунитета насекомых поможет создать новые антибиотики

https://www.gazeta.ru/science/news/2017/04/28/n_9983489.shtml

А.Яковлев Один в поле не воин: природная антимикробная система эффективнее антибиотика

<https://biomolecula.ru/articles/odin-v-pole-ne-vojn-prirodnaia-antimikrobnaia-sistema-effektivnee-antibiotika>

Публикации:

- 1. - Исследование иммунитета насекомых поможет создать новые антибиотики** Газета.Ру, - (год публикации -).
- 2. - Один в поле не воин: природная антимикробная система эффективнее антибиотика** Биомолекула, - (год публикации -).
- 3. - Антибиотикорезистентность: How to make antibiotics great again?** Биомолекула, - (год публикации -).
- 4. Кругликова А.А. cDNA of larvae Calliphora vicina: whole body extract** BioProject, - (год публикации - 2017).
- 5. Черныш С.И., Гордя Н.А., Тулин Д.В., Яковлев А.Ю. Biofilm infections between Scylla and Charybdis: interplay of host antimicrobial peptides and antibiotics. Infection and drug resistance** Infection and Drug Resistance, - (год публикации - 2017).
- 6. Черныш С.И., Гордя Н.А., Яковлев А.Ю. Насекомые и медицина – от молекул иммунного ответа к лекарствам нового типа.** Материалы XV съезда Русского энтомологического общества, - (год публикации - 2017).
- 7. Черныш С.И., Гордя Н.А., Яковлев А.Ю. Способ разрушения и предотвращения образования бактериальных биопленок комплексом антимикробных пептидов насекомых -**, № 2017120258 (год публикации -).

Аннотация результатов, полученных в 2018 году:

Идея проекта состояла в конверсии отходов птицеводства в продукты с высокой добавленной стоимостью. Для её реализации была разработана технология перевода куриной крови в биомассу личинок синей мясной мухи *Calliphora vicina*. Опыт и знания коллектива лаборатории в области иммунологии насекомых были использованы для индукции синтеза во вновь полученной биомассе веществ с антимикробной (FLIP7) и иммуноадьювантной (арилфорин) активностями и их последующей экстракции. Отдельным направлением проекта стали исследования, направленные на изучение возможных областей практического применения этих веществ.

За отчетный период была доработана масштабируемая технология перевода куриной крови в биомассу личинок *S. vicina*. Определены оптимальные диапазоны показателей, регулирующих жизненный цикл продуцента (фотопериод, температура, плотность заселения субстрата, влажность) и позволяющие полностью утилизировать пищевой субстрат. Конечной точкой этого этапа технологии является пауза, позволяющая накапливать значительную биомассу продуцента. Возможность использования в качестве продуцентов личинок других видов мух-каллифорид позволяет смещать акцент технологии в сторону увеличения выхода биомассы продуцента либо утилизации больших объемов субстрата. Решён вопрос с микробиологической безопасностью и воспроизводимостью биотехнологического процесса. Проведены расчёты экономической эффективности технологии.

Обобщенные данные, касающиеся всех этапов разработанной технологии, включая детальные условия, параметры и расчёты, относящиеся к процессам получения биомассы и целевого продукта, изложены в рукописи статьи, поданной в Poultry Science (Oxford University Press) – журнал №1, посвященный проблемам птицеводства (<https://academic.oup.com/ps/pages/About>).

Наиболее перспективными областями применения целевых продуктов определены борьба с резистентными микроорганизмами и повышение эффективности вакцинации в ветеринарии и медицине.

Проведенные исследования показали прямую активность комплекса антимикробных пептидов FLIP7 в отношении биоплёночных форм бактериальных инфекций и его адьювантные свойства при комбинированном применении с антибиотиками. Подтверждена возможность элиминации клеток-персистеров, являющихся причиной неустойчивой эффективности активных антибиотиков. Определены синергические пары FLIP7 с представителями четырех классов антибиотиков и показаны возможности расширения для них «фармакологического окна».

Полученные результаты были опубликованы в 2018 году в журнале Infection and Drug Resistance. За четыре недели после публикации статья была просмотрена на сайте журнала 723 раза, авторы проекта получили от редакции приглашение вступить в группу привилегированных авторов. На момент подачи отчёта статья была просмотрена более 6000 раз, pdf-файл статьи скачан более 600 раз (https://www.dovepress.com/article_metric.php?article_id=37655).

Проведена оценка стабильности комплекса FLIP7 в предложенной гелевой форме.

Совместно с сотрудниками Всероссийского научно-исследовательского института птицеводства разработана и проведена программа по изучению адьювантных свойств арилфорина. В сравнительных опытах на моделях профилактики инфекционных заболеваний кур показана сопоставимая эффективность арилфорина, KLN («золотого стандарта» карьерных белков) и стандартного адьюванта, применяемого в ветеринарии. При этом появление специфических антител и достижение их протективного уровня в группе с арилфоринем происходило на неделю раньше. Данные по этому направлению проекта готовятся к публикации.

Публикации:

- 1. - Мясные мухи улучшают антибиотики** Наука и жизнь, - (год публикации -).
- 2. - Ученые СПбГУ разработали антибиотик нового поколения от опасных бактерий** Город плюс, - (год публикации -).
- 3. - Личинки мясных мух помогли найти новое средство против инфекций** Газета.ru, - (год публикации -).
- 4. - Опарыши помогли ученым из России найти мощного "киллера" бактерий** РИА Новостей, - (год публикации -).
- 5. А.Ю.Яковлев, А.А.Кругликова, С.И.Черныш Мухи-каллифориды в медицинской биотехнологии** Энтомологическое обозрение, - (год публикации - 2018).

6. Яковлев А.Ю., Несин А.П., Симоненко Н.П., Тулин Д.В., Гордя Н.А., Кругликова А.А., Черныш С.И. Chicken blood conversion to biopharmaceuticals: fly biotechnology approach Poultry Science, - (год публикации - 2018).
