

**ВЕСТНИК БИОТЕХНОЛОГИИ
И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
ИМЕНИ Ю.А. ОВЧИННИКОВА**

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

Р.Г. Василов, В.С. Воробьев, Т.Н. Гаева, А.А. Назаренко

Редакционный совет

Ш.О. Бастуабаева (Алмаатинская обл., Республика Казахстан), Р.Р. Исламов (Казань),
М.П. Кирпичников (Москва), Э.И. Коломиец (Минск, Республика Беларусь), С.В. Костров (Москва),
Д.А. Лиознов (Санкт-Петербург), С.В. Нетесов (Новосибирск), Т.В. Овчинникова (Москва),
А.Н. Панин (Москва), В.О. Попов (Москва), Е.Д. Свердлов (Москва),
А.А. Цыганков (Пушино), В.М. Чернов (Казань), А.С. Яненко (Москва)

Журнал зарегистрирован в Росохранкультуре
Рег. ПИ № ФС77-19745 от 11 апреля 2005 г.

Зав. редакцией О.В. Коломбет

Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: vestnik@biorosinfo.ru, vorobyev095@yandex.ru

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр

медико-социальных проблем»

Адрес: 127581 Москва, Керамический проезд, 53, кор. 1

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

**BULLETIN OF BIOTECHNOLOGY
AND PHYSICO-CHEMICAL BIOLOGY
NAMED AFTER Yu.A. OVCHINNIKOV**

Scientific and practical journal

Founded in 2005

Chief editor

R.G. Vasilov

Editorial board

R.G. Vasilov, V.S. Vorobyev, T.N. Gaeva, A.A. Nazarenko

Editorial council

Sh.O. Bastuabayeva (Alma-Ata region, Republic of Kazakhstan), R.R. Islamov (Kazan),
M.P. Kirpichnikov (Moscow), E.I. Kolomiets (Minsk, Republic of Belarus), S.V. Kostrov (Moscow),
D.A. Lioznov (St. Petersburg), S.V. Netesov (Novosibirsk), T.V. Ovchinnikova (Moscow),
A.N. Panin (Moscow), V.O. Popov (Moscow), E.D. Sverdlov (Moscow),
A.A. Tsygankov (Pushchino), V.M. Chernov (Kazan), A.S. Yanenko (Moscow)

The journal is registered in Rosokhrankultura
Reg. PI No. FS77-19745 dated April 11, 2005

Head edited by O.V. Colombet

Address: 123060, Moscow, PO Box 3

Tel.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: vestnik@biorosinfo.ru, vorobyev095@yandex.ru

Founder and Publisher:

ANO «Information and Analytical Center
medical and social problems»

Address: 127581 Moscow, Keramicheskyy proezd, 53, box. one

Tel.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Published with the support of the
Russian Biotechnology Society named after Yu.A. Ovchinnikov

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. Р.Г. Васильев 5

Оригинальные статьи

Комплексная характеристика штаммов *Vibrio cholerae* – R-вариант.
Д.А. Левченко, В.Д. Кругликов, О.А. Подойницына, Н.Б. Непомнящая, Н.А. Селянская,
А.С. Водопьянов, М.И. Ежова, М.В. Ренгач, А.К. Носков 6

Подбор оптимального состава питательной среды и условий глубинного культивирования микробного продуцента бактериостатических соединений.
И.А. Гнеушева, А.В. Лушников 15

Определение уровня экспрессии гена *ctxA* штамма *Vibrio cholerae* 569В в процессе глубинного культивирования методами ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени и цифровой капельной ПЦР.
А.В. Гаева, С.А. Воробьева, О.С. Дуракова, О.В. Громова, А.А. Крицкий,
Л.Ф. Ливанова, О.А. Волох 25

Оценка генетического разнообразия сортообразцов кормовых культур *Dactylis glomerata* L., *Agropyron rectiniforme* Roem. et Schult и *Phleum pratense* L., отобранных в условиях Республики Башкортостан.
Б.Р. Кулуев, Э.А. Бережнева, К.П. Гайнуллина, А.И. Габитова, А.А. Низаева 32

Анализ тенденций показателей качества отечественного Иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади жидкого как элемента системы менеджмента качества на предприятии-производителе.
А.А. Савенкова, О.А. Лобовикова, Е.Г. Абрамова, И.В. Шульгина, С.В. Генералов,
А.С. Феськова, С.С. Галетова, А.К. Никифоров 41

Изучение токсикологических свойств кормовой добавки на основе экстрактов лекарственных растений на лабораторных животных.
А.А. Курилова, И.И. Кочиш, Л.Ю. Карпенко, О.О. Бабич, И.Н. Никонов 51

Антибактериальная активность наночастиц меди, железа, цинка и низкоинтенсивного лазерного излучения при отдельном и совместном применении.
В.В. Алипов, О.Г. Шаповал, М.А. Полиданов, И.Е. Кондрашкин, И.С. Блохин,
И.Ш. Расулов, В.А. Карсаков, Т.А. Турбулатов, А.Г. Мусаелян, А.И. Алипов 58

Обзоры

Актуальность изучения иерсиниозных бактериофагов.
А.О. Аноприенко, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова, А.В. Тюрина 65

Использование одноразовых биореакторных систем для суспензионного культивирования растительных клеток.
А.А. Данилова, Н.С. Пивоварова 75

Страницы истории. Юбилейные и знаменательные даты 2023 года 89

Хроника

К 100-летию со дня рождения академика РАМН Анатолия Андреевича Воробьева (1923–2023).
А.Ю. Миронов 92

Правила для авторов 95

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. R.G. Vasilov 5

Original articles

Complex characteristics of *Vibrio cholerae* strains – R-variant.

D.A. Levchenko, V.D. Kruglikov, O.A. Podoinitsyna, N.B. Nepomnyashchaya, N.A. Selyanskaya, A.S. Vodopyanov, M.I. Yezhova, M.V. Rengach, A.K. Noskov..... 6

Selection of the optimal composition of the nutritional medium and conditions for deep cultivation of a microbial producer of bacteriostatic compounds.

I.A. Gneusheva, A.V. Lushnikov 15

Determination of the level of expression of the *ctxA* gene of the *Vibrio cholerae* 569b strain in the process of deep cultivation by RT-PCR methods with hybridization-fluorescence accounting of the results in real time and droplet digital PCR.

A.V. Gaeva, S.A. Vorobieva, O.S. Durakova, O.V. Gromova, A.A. Kritsky, L.F. Livanova, O.A. Volokh 25

Assessment of the genetic diversity of breeding lines of forage crops *Dactylis glomerata* L., *Agropyron pectiniforme* Roem. et Schult and *Phleum pratense* L., selected in the conditions of the Republic of Bashkortostan.

B.R. Kuluev, Z.A. Berezheva, K.P. Gainullina, A.I. Gabitova, A.A. Nizaeva 32

Analysis of trends in quality indicators of domestic anti-rabies immunoglobulin from horse blood serum liquid as an element of the quality management system at the manufacturing company.

A.A. Savenkova, O.A. Lobovikova, E.G. Abramova, I.V. Shulgina, S.V. Generalov, A.S. Feskova, S. S. Galetova, A.K. Nikiforov 41

Studying the toxicological properties of a feed additive based on medicinal plant extracts on laboratory animals.

A.A. Kurilova, I.I. Kochish, L.Yu. Karpenko, O.O. Babich, I.N. Nikonov 51

Antibacterial activity of copper, iron and zinc nanoparticles and low-level laser radiation in their separate and combined application.

V.V. Alipov, O.G. Shapoval, M.A. Polidanov, I.E. Kondrashkin, I.S. Blokhin, I.Sh. Rasulov, V.A. Karsakov, T.A. Tirbulatov, A.G. Musaelyan, A.I. Alipov..... 58

Reviews

Relevance of studying yersinia bacteriophages.
A.O. Anoprienko, N.E. Gaevskaya, M.P. Pogozhova, A.V. Tyurina 65

Use of disposable bioreactor systems for suspension cultivation of plant cells.
A.A. Danilova, N.S. Pivovarova 75

Pages of history. Anniversary and significant dates 2023 89

The chronicle

To the 100th anniversary of the birth of academician of the Russian Academy of Medical Sciences Anatoly Andreevich Vorobiev (1923–2023).

A.Yu. Mironov..... 92

Rules for authors 95

К читателям

Первый номер 2023 года открывается статьей специалистов из Ростовского-на-Дону противочумного института, посвященной проведению сравнительного изучения генетической организации штаммов холерных вибрионов R-вариант с оценкой антибиотикорезистентности (Левченко Д.А. с коллегами).

Гнеушевой И.А., Лушниковым А.В. из Орловского государственного аграрного университета имени Н.В. Парахина была исследована зависимость диаметра колоний микроскопического гриба *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 от состава питательных сред.

Коллектив сотрудников из Российского НИПЧИ «Микроб» (Саратов) и московского Биотехнологического кампуса (Гаева А.В. и др.), применив модифицированный метод ПЦР, установили опережение экспрессии гена *ctxA* на 1–2 часа по сравнению с приростом биомассы и регистрируемым выходом холерного токсина в культуральную жидкость.

Исследователи из учреждений РАН и Башкирского государственного университета (Кулуев Б.Р. и др.) апробировали ряд известных SSR-праймеров на сортообразцах житняка ширококолосого, тимофеевки луговой и ежи сборной, отобранных в условиях Южной лесостепной зоны Республики Башкортостан.

Специалисты из РосНИПЧИ «Микроб» и Саратовского государственного университета генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова (Савенкова А.А. и др.) провели статистический анализ многолетних показателей качества иммунобиологического лекарственного препарата «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошадей жидкий».

Авторский коллектив из научных учреждений Санкт-Петербурга, Москвы и Калининграда (Курилова А.А. и др.) осуществили изучение на лабораторных животных токсикологических свойств кормовой добавки на основе экстрактов лекарственных растений.

Алипов В.В. и др. (Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского) оценили антибактериальную активность наночастиц железа, меди, цинка и низкоинтенсивного лазерного излучения при отдельном и совместном применении.

В номере, кроме оригинальных статей, помещены два обзора. Один из них принадлежит авторам из Ростовского-на-Дону противочумного института. Ростовчане вообще периодически представляют добротный материал по важной теме изучения бактериофагов. В рассматриваемой работе Аноприенко А.О. с коллегами дан материал по иерсиниозным бактериофагам. В другом обзоре (Данилова А.А., Пивоварова Н.С., Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет) затронут и досконально рассмотрен вопрос об использовании одноразовых биореакторных систем для суспензионного культивирования растительных клеток.

В заключение поставлены разделы по знаменательным историческим датам и хроника.

Главный редактор,
президент Общества биотехнологов России,
профессор Р.Г. ВАСИЛОВ

КОМПЛЕКСНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* – R-ВАРИАНТ

Д.А. ЛЕВЧЕНКО*, В.Д. КРУГЛИКОВ, О.А. ПОДОЙНИЦЫНА, Н.Б. НЕПОМНЯЩАЯ, Н.А. СЕЛЯНСКАЯ, А.С. ВОДОПЬЯНОВ, М.И. ЕЖОВА, М.В. РЕНГАЧ, А.К. НОСКОВ

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

В ходе проведения мониторинговых исследований объектов окружающей среды на территории России периодически на фоне выделения нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы регистрируют изоляты, атипичные по признаку агглютинабельности (R-вариант). Установлено распространение антибиотикорезистентности микроорганизмов, обусловленное мутациями, генетическими перестройками, происходящими в популяциях бактерий. Целью работы явилось проведение сравнительного изучения генетической организации штаммов холерных вибрионов R-вариант с оценкой антибиотикорезистентности. В работе использовали 63 штамма *V. cholerae* R-вариант, изолированных из ООС на территориях бывших Республик СССР и субъектов России. Установлена подгруппа штаммов – «истинные R-варианты», состоящая из шести изолятов, которые агглютинировались только RO диагностической холерной сывороткой в диагностическом титре. Показано, что в их геноме отсутствовал ген *mshA*, что можно трактовать как особенность генетической организации этой группы штаммов. Выявлена популяция эпидемически значимых штаммов с идентичными ПЦР-генотипами. Способность агглютинироваться RO-сывороткой свойственна штаммам с разными генетическими профилями. Способность штаммов *V. cholerae* агглютинироваться RO-сывороткой не отражается на групповом профиле антибиотикочувствительности, свойственном холерным вибрионам. В результате микробиологических, молекулярно-генетических исследований выявлены различия при дифференциации штаммов холерных вибрионов R-вариант по генетическим профилям и серологическим группам. Это косвенно свидетельствует о разнообразии филогенеза изучаемых штаммов, позиционируемых как R-вариант холерных вибрионов.

Ключевые слова: холерный вибрион R-вариант, мониторинг, агглютинабельность, ПЦР-генотипирование, антибиотикорезистентность.

Введение

В ходе проведения мониторинговых исследований объектов окружающей среды (ООС) на территории России периодически на фоне выделения нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы (S-форма) регистрируют изоляты, атипичные по признаку агглютинабельности – *V. cholerae* R-вариант [5]. В соответствии с МУК 4.2.3745-22 «Методы лабораторной диагностики холеры» при проведении идентификации выделенных культур *V. cholerae* O1, O139 и R-вариант, наряду с бактериологическим и

серологическим методами, проводится ПЦР-анализ, направленный на определение генов эпидемической значимости (*ctxA*, *tcpA*), принадлежности к O1 (*wbeT*) и O139 серогруппам (*wbfR*).

По данным литературы, штаммы холерных вибрионов R-вариант представляют собой форму антигенной изменчивости, обусловленную выработкой в процессе эволюции механизмов адаптации к разнообразным способам существования в ООС [2]. К. De et al. (2004) установлено, что появлению штаммов *V. cholerae* R-вариант предшествует период смены серовара с Инаба на Огава или наоборот. Кроме того, показано, что серологические особенности изолятов холерных вибрионов R-вариант связаны со строением O-липополисахарида, за биосинтез которого отвечают гены кластера *wbe* (*rfb*) [12, 13]. Так, у ряда штаммов *V. cholerae* R-вариант, изолированных из ООС, выявлено отсутствие гена *wbeT*. Евдокимовой В.В. с соавт. (2022) показано, что у S- и R-штаммов имеются общие детерминанты O-антигена (R-антигена), не кодирующиеся геном *wbeT*, на что указывает отсутствие гена *wbeT* и в то же время способность некоторых штаммов взаимодействовать с МКА-O1 [2].

© 2023 г. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Подойницына О.А., Непомнящая Н.Б., Селянская Н.А., Водопьянов А.С., Ежова М.И., Ренгач М.В., Носков А.К.

* Автор для переписки:

Левченко Дарья Александровна

к.м.н., старший научный сотрудник, и.о. зав. лабораторий экспериментально-биологических моделей и биологической безопасности, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

E-mail: levchenko_da@antiplague.ru

Одна из задач эпидемиологического анализа заключается в выявлении генетических связей между штаммами *V. cholerae* со сходными фенотипическими свойствами методом молекулярного типирования, который позволяет выявлять сходства/различия сравниваемых изолятов. Углубленная молекулярно-генетическая характеристика микробных патогенов основывается на изучении отдельных локусов генома с применением различных подходов к молекулярному типированию [3, 8, 9]. Одним из таких подходов является ПЦР-генотипирование по 14 генам-мишеням [4]. Ранее данный метод типирования позволил дифференцировать нетоксигенные штаммы холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп с высокой дискриминирующей способностью, а также выявить различия среди штаммов O139, выделенных в различных географических регионах страны [7]. Вот почему мы посчитали целесообразным применение ПЦР-типирования для систематизации и выявления межштаммовых различий группы культур *V. cholerae* R-вариант.

В настоящее время установлено распространение антибиотикорезистентности бактерий, обусловленное му-

тациями, генетическими перестройками, происходящими в популяциях микроорганизмов. Кроме того, доказано, что экологические ниши, особенно поверхностные водоемы, являются идеальной средой для передачи маркеров устойчивости среди микроорганизмов.

В свете вышесказанного, помимо изучения генетической организации штаммов холерных вибрионов, выделяемых из ООС, актуальным является контроль чувствительности/устойчивости холерных вибрионов к антибактериальным препаратам [10, 11].

В связи с этим цель исследования заключалась в проведении сравнительного изучения генетической организации штаммов холерных вибрионов R-вариант с оценкой антибиотикорезистентности.

Материалы и методы

Штаммы. В работе использовано 63 штамма *V. cholerae* R-вариант, изолированных из ООС на территориях бывших Республик СССР и субъектов России (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика штаммов *V. cholerae* R-вариант

Группы штаммов <i>V. cholerae</i> R-вариант			Ссылка
«Гетерогенная» (SR)	«Консервативная» (R)	«Не агглютинирующие» (nonO1/nonO139)	
агглютинабельность в разных сочетаниях сыворотками O1, <i>Ogawa</i> или <i>Inaba</i>	агглютинабельность только сывороткой холерной RO	утрата агглютинабельности со всеми диагностическими холерными сыворотками	Левченко Д.А. с соавт., 2021 [6]
<i>ctxA+tcpA+wbeT+ wbfR-</i> , <i>ctxA-tcpA+wbeT+ wbfR-</i> , <i>ctxA-tcpA-wbeT+ wbfR-</i> ,	<i>ctxA-tcpA-wbeT- wbfR-</i>	<i>ctxA-tcpA-wbeT- wbfR-</i>	
20	24	19	
63			

Исследуемые штаммы *V. cholerae* R-вариант выделены из ООС на территории бывшего СССР (Казахская ССР — 1988, 1989, 1991; Каракалпакская АССР — 1989, 1991; Таджикская ССР — 1989; Крымская АССР — 1991) и пяти федеральных округов России: Южный федеральный округ (Республика Калмыкия — 2012, 2019; Ростовская область — 1999, 2012, 2019); Центральный федеральный округ (Московская область — 2006, 2014); Северо-Западный федеральный округ

(Ленинградская область — 1999); Дальневосточный федеральный округ (Приморский край — 1991, 1998, 2000, 2001, 2003, 2016; Забайкальский край — 1993, 1994; Хабаровский край — 2003, 2006); Сибирский федеральный округ (Иркутская область — 2018, 2019, 2020; Новосибирская область — 1994, 2002, 2006).

ПЦР-типирование штаммов *V. cholerae* R-вариант проводили по расширенному спектру, включающему в себя 14 генов-мишеней (табл. 2).

**Генетические детерминанты, используемые для типирования штаммов
холерных вибрионов O1 серогруппы и R-варианта**

№ п/п	Кластер	Гены	Нуклеотидные последовательности праймеров	Длина амплификата, п.н.	t отжига, °C
1	RS1, RS2	<i>rstA</i>	ACTCGATACAAACGCTTCTC AGAATCTGGAAGGTTGAGTG	1009	58
2	RTX	<i>rtxC</i>	CTGAATATGAGTGGGTGACTTACG GTGTATTCTTCGATATCCGCTACG	417	55
3		<i>ACD- rtxA</i>	TCAACCAACGGGTCAACTGGC GCGGGATCATCCAACGTGGT	660	58
4	VPI	<i>tcpA</i>	GAAGAAGTTTGTAAGAAGAACAACAC GAAAGCACCTTCTTTCACGTTG	471	58
5	VPI-2	<i>int</i>	CCGCAAGGCAAATTCAAACCG TGGCCGTAATGCAGCGATGG	458	58
6		<i>nanH</i>	TTGCAATGTTCCGGTATGGCGA CACGATAAGCGGCGACACCAT	585	58
7		<i>vce</i>	CAAGGCCGATCTATTGGCTCC GGGTTTTGCGGTGTGCATC	1009	58
8	mshA	<i>mshA</i>	TCTCGGTATCTTGGCCGTCACA TGCATAGCAACCGTTGCAGGAT	432	58
9	-	<i>stn sto</i>	TCCGATTTAGCCAAACAGTAGAAA GCTGGATTGCAACATATTTCCG	172	50
10	T3SS	<i>vcsN2</i>	ATGCGTCGACAGTTGAGCCAATTCATT ATGCTCTAGACGACCAAACGAGATAATG	508	55
11		<i>vspD</i>	ATCGTCTAGAACTCGAAGAGCAGAAAAAGC ATCGGTGACCTTCCCGCTTTTGATGAAATG	422	55
12	T6SS	<i>vasK</i>	ATGATGGTGCGTTAGAGCGCCG GGAAGCCGCATCATCAAAGCG	614	58
13		<i>vgrG1</i>	TCCACTAAGGCAACGCCGGA CCGACATGGGGTCCCATTCAT	735	58
14		<i>vgrG3</i>	GTGGCCGAAGAGAAAACACCGG GGCCTCTTCCCTGCCGACTCAT	422	58

Кластерный анализ штаммов холерных вибрионов проводили с использованием метода UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) [14]. При анализе результатов были использованы параметрические статистические методы ($p < 0,05$) [1].

Чувствительность/устойчивость к антибактериальным препаратам изучаемых штаммов к 11 антибактериальным препаратам определяли методом серийных разведений на плотной питательной среде [агар Мюллера – Хинтона, pH 7,5 (HIMEDIA, Индия)]. Посевная доза взвесей 16–18 часовых агаровых культур составляла $n \times 10^6$ м.к. по отраслевому стандарту

мутности ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО-42-28-86). Интерпретацию результатов проводили в соответствии с МУК 4.2.2495-09 «Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сеп, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам». Для постановки контроля использовали антибиотикочувствительные штаммы: *V. cholerae* O1 El Tor P-5879 (*ctxA⁺tcpA⁺*, выделен от больного в Ростовской области в 1972 г.) и *V. cholerae* nonO1/nonO139 P-9741 (KM162) (*ctxA⁻tcpA⁻*, выделен из поверхностного водоема в Ростовской области в 1979 г.).

Результаты и обсуждение

Изоляты холерных вибрионов R-вариант исследованы в развернутой реакции агглютинации с холерными диагностическими серогрупповыми и серовароспецифическими сыворотками (O1, O139, *Ogawa*, *Inaba* и RO), а также методом ПЦР с целью определения генов *ctxA*, *tcrA*, *wbeT*, *wbfR* [10]. В ходе проведения анализа из «консервативной» (R) группы штаммов выделена подгруппа, условно обозначенная как «истинные R-варианты», то есть культуры, агглютинирующие только с сывороткой RO в диагностическом титре (1/800).

Для установления генетических связей между различными группами штаммов *V. cholerae* R-вариант

со сходными фенотипическими свойствами проведено молекулярное типирование рассматриваемых в данном исследовании изолятов. При анализе генетической организации штаммов холерных вибрионов R-вариант различной эпидемиологической значимости выявлено 38 генотипов, объединенных в семь отдельно расположенных кластеров А–G (рис. 1). В кластер А, Е и F вошли практически все изоляты трех изучаемых групп. Кластеры С, D и G включали в себя изоляты из «гетерогенной» группы. При этом кластер С объединил только эпидемически опасные штаммы, изолированные в Приморском крае и Казахской ССР. Кластер В сформирован штаммами «гетерогенной» и «консервативной» групп.

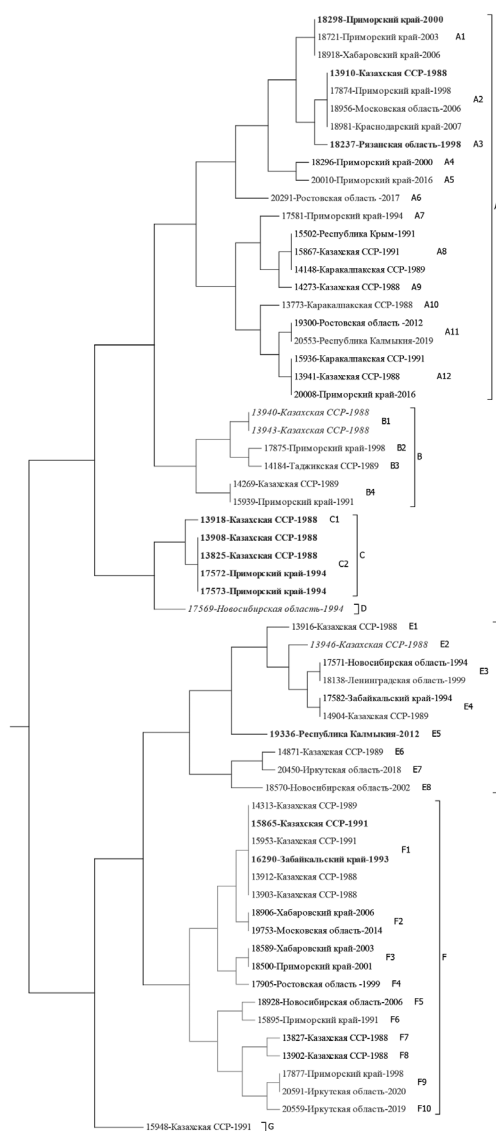


Рис. 1. Дендрограмма распределения штаммов холерных вибрионов R-варианта различных серогрупп по 14 генам-мишеням, изолированных из ООС на различных территориях России и бывшего СССР. 1988–2020 г. *Примечание:* Синим цветом выделены штаммы *V. cholerae* R-вариант «консервативной» группы; Синим цветом («жирный») — *V. cholerae* R-вариант подгруппа «истинные R-варианты»; Бордовым — *V. cholerae* R-вариант «гетерогенной» группы; Черным — *V. cholerae* R-вариант «не агглютинирующей» группы (объяснение в тексте).

Генотипическая характеристика штаммов *V. cholerae* R-вариант

Кластер	RS-элемент	VPI-1	VPI-2			MARTX		T6SS			T3SS		<i>mshA</i>	<i>stn/sto</i>	Всего
	<i>rstA</i>	<i>tcpAelt</i>	<i>int</i>	<i>nanH</i>	<i>vce</i>	<i>rtxC</i>	<i>acd-rtxA</i>	<i>acd-vgrG1</i>	<i>pbdd-vgrG3</i>	<i>vasK</i>	<i>vasN2</i>	<i>vspD</i>			
A	-*	-	+	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+/-	-	22
B	-	+/-	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+/-	-	6
C	+**	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	5
D	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1
E	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+	-	-	+/-	-	10
F	-	-	+/-	-	-	+	+	+/-	+/-	+	-	-	+/-	-	18
G	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	1
Итого															63

Примечание: * – отсутствие гена; ** – наличие гена

В ходе изучения генетической организации популяции *V. cholerae* R-вариант установлено, что кластер А представлен двенадцатью генотипами, куда вошли 22 штамма (34,9%). Наибольшее количество культур было изолировано на территории Приморского края (31,8% от общего числа штаммов). Вышеуказанный кластер оказался самым распространенным и был представлен нетоксигенными штаммами различных сероваров, выделенными из ООС на территории восьми субъектов РФ и двух бывших республик СССР. Кластер В включал в себя четыре генотипа и состоял из шести изолятов (9,5%), выделенных из ООС одного субъекта России и двух бывших республик СССР. Данный кластер содержал только нетоксигенные штаммы, отнесенные как к «консервативной» группе, так и «гетерогенной». Кластер С включал только токсигенные культуры «гетерогенной» группы, отнесенные к двум генотипам, состоящим из пяти штаммов (7,9%), которые были изолированы из ООС Приморского края и Казахской ССР. Кластер D представлен одним штаммом «гетерогенной» группы, выделенным из поверхностного водоема Новосибирской области. Кластер E состоял из восьми генотипов, включал в себя 10 штаммов (15,9%) и был представлен штаммами из четырех изучаемых групп. Изоляты данного кластера были выделены из водоемов четырех административных территорий России, а также на одной территории бывшего СССР. Кластер F представлен 18 штаммами холерных вибрионов всех изучаемых групп (28,6%), которые образовали 10 генотипов. Такие штаммы были изолированы из ООС семи административных территорий России и одной бывшей республики СССР. Кластер G включал в себя один штамм холерного вибриона из «гетерогенной» группы, который был выделен на территории бывшей республики СССР (табл. 3).

Особый интерес вызвала группа штаммов, условно обозначенная как «истинные R-варианты» (см. рис. 1), состоящая из шести штаммов. Такие штаммы были выделены из ООС на территориях: Казахской ССР (1988, 1991), Забайкальского края (1993), Рязанской области (1998), Приморского края (2000), Республики Калмыкия (2012). Проведено изучение расположения данных штаммов на дендрограмме. Установлено их распределение между тремя кластерами, а именно: кластер А (генотип А1, А2 и А3); кластер E (генотип E5) и кластер F (генотип F1). Выявлен ряд особенностей генетической организации «истинных R-вариантов». Стоит отметить, что у всех вышеуказанных штаммов отсутствовал ген маннозочувствительных пилей адгезии (*mshA*). Так, изоляты, отнесенные к ветви А имели межштаммовые различия в структуре острова патогенности VPI-2. Штаммы, вошедшие в кластер F, принадлежали к одному генотипу F1 и отличались от вышеуказанных штаммов отсутствием генов системы секреции третьего типа T3SS. Изолят *V. cholerae* образовал отдельную ветвь E (генотип E5) от других штаммов, его особенность состояла в отсутствии гена активного домена MARTX (*acd-rtxA*), в то время как *rtxC* – активатор MARTX присутствовал в геноме.

Генетическая организация штаммов *V. cholerae* R-вариант (на основе 14 структурных генов) демонстрирует значительную гетерогенность популяции данных изолятов. Однако установлено наличие структурного гена сайта интеграции острова патогенности VPI-2 (*int*), *rtxC* – активатора MARTX, его активного домена MARTX (*acd-rtxA*), а также структурного гена кластера системы секреции шестого типа T6SS (*vasK*) у 99,9% изолятов R-варианта, которые, возможно, являются консервативными для штаммов всех изучаемых групп.

Следующим этапом исследования явилась оценка антибиотикорезистентности 63 штаммов холерных вибрионов к 11 антибактериальным препаратам. Установлено, что все изучаемые штаммы сохраняли чувствительность к доксициклину и гентамицину. Наибольший процент устойчивых культур *V. cholerae* R-вариант трех групп («консервативная», «гетерогенная», «не агглютинирующаяся») установлен к фуразолидону в 55,0%, 42,8% и 45,0%, соответственно (табл. 4).

Антибиотикограмма «консервативной» группы штаммов холерных вибрионов показала резистентность к левомицетину (10,0% культур, МПК=8 мг/л), цефотаксиму (15,0% МПК=0,5 мг/л) и налидиксовой кислоте (15,0% МПК=128 мг/л). Кроме того, выявлена резистентность 25,0% культур *V. cholerae* R-вариант к ампициллину (25,0% изолятов МПК=256 мг/л) и триметоприму/сульфаметоксазолу (25,0% изолятов, МПК=32/160 мг/л).

Оценка антибиотикорезистентности «гетерогенной» группы штаммов показала резистентность: у 4,8%

изолятов к тетрациклину (МПК=16 мг/л), по 9,5% культур к рифампицину и левомицетину (МПК=16 мг/л), 9,5% к ампициллину (МПК=256 мг/л), 9,5% к цефотаксиму (МПК=4 мг/л) и 9,5% к ципрофлоксацину (МПК=0,5 мг/л). Выявлена устойчивость 23,8% штаммов *V. cholerae* SR к налидиксовой кислоте (МПК=128 мг/л) и 13,6% — к триметоприму/сульфаметоксазолу (МПК=160 мг/л).

При анализе спектра устойчивости изолятов «не агглютинирующейся» группы выявлена резистентность к беталактам (31,8% культур устойчивы к ампициллину МПК=256 мг/л и 13,0% — к цефотаксиму МПК=4 мг/л). Также установлена устойчивость 9,0% изолятов холерных вибрионов к триметоприму/сульфаметоксазолу (МПК=160 мг/л). Диапазоны значений минимальных подавляющих концентраций изучаемых штаммов *V. cholerae* R-вариант, а также контрольных штаммов холерных вибрионов приведены в таблице 4.

Таблица 4

Устойчивость к антибактериальным препаратам штаммов *V. cholerae* R-вариант, изолированных из ООС на различных территориях России и бывшего СССР. 1988–2020 гг.

№ п/п	Антибактериальный препарат	Группы штаммов <i>V. cholerae</i> R-вариант		
		«R»	«SR»	«nonO1/nonO139»
Количество устойчивых культур, %				
1	Тетрациклин	0	4,8	0
2	Доксициклин	0	0	0
3	Левомецетин	10,0	9,5	0
4	Ампицилин	25,0	9,5	31,8
5	Цефотаксим	15,0	9,5	13,6
6	Налидиксовая кислота	15,0	23,8	9
7	Ципрофлоксацин	5,0	9,5	0
8	Рифампицин	0	4,8	0
9	Гентамицин	0	0	0
10	Фуразолидон	55,0	42,8	45,0
11	Триметоприм/сульфаметоксазол	25,0	13,6	9,0

Таким образом, на основании проведенного анализа варибельности биологических свойств 63 штаммов холерных вибрионов R-вариант установлена подгруппа штаммов — «истинные R-варианты», состоящая из шести изолятов, которые агглютинировались только РО диагностической холерной сывороткой в диагностическом титре. Показано, что в геноме всех штаммов, относящихся к «истинным R-вариантам», отсутствовал ген маннозочувствительных пилей адгезии (*mshA*), что можно трактовать как особенность генетической организации этой группы штаммов.

Выявлена значительная гетерогенность генетической организации популяции штаммов *V. cholerae* R-вариант. Показано, что использование метода ПЦР-типирования по 14 генам-мишеням позволяет дифференцировать токсигенные штаммы *V. cholerae* R-вариант от нетоксигенных культур. Установлена популяция эпидемически значимых штаммов с идентичными ПЦР-генотипами. Обнаружено, что способность агглютинироваться РО-сывороткой свойственна штаммам с разными генетическими профилями. Можно предположить, что изменения в структуре О-антигена, ведущие за собой смену типа агглютинации, происходят

независимо и являются приспособительной особенностью штаммов к условиям окружающей среды.

Проведенный анализ антибиотикорезистентности холерных вибрионов R-вариант трех групп показал наличие чувствительности всех изучаемых групп штаммов к доксициклину и гентамицину. Наибольшее число штаммов *V. cholerae* R-вариант было устойчиво к фуразолидону, триметоприму/сульфаметоксазолу, налидиксовой кислоте и ампициллину, что коррелирует с результатами антибиотикочувствительности/резистентности нетоксигенных культур *V. cholerae* O1 El Tor, выделенных на территории Российской Федерации за пятнадцатилетний период. В соответствии с полученными данными можно заключить, что способность штаммов *V. cholerae* агглютинироваться RO-сывороткой не отражается на групповом профиле антибиотикочувствительности, свойственном холерным вибрионам.

Обобщая полученные нами результаты микробиологических, молекулярно-генетических исследований выявлены разночтения при дифференциации штаммов холерных вибрионов R-вариант по генетическим профилям и серологическим группам. Это косвенно свидетельствует о разнообразии филогенеза изучаемых штаммов, позиционируемых как R-вариант холерных вибрионов. На наш взгляд, перспективным направлением данного исследования является полногеномное секвенирование штаммов холерных вибрионов R-вариант, как вновь выделенных штаммов, так и обнаруженных ранее, и биоинформационный анализ его результатов для выявления особенностей филогенеза атипичных по агглютинабельности штаммов холерных вибрионов и установления их происхождения.

Литература:

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. — Л.: Медгиз, 1962. — 180 с.
2. Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Якушева О.А., Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Зюзина В.П., Яговкин М.Э. Изучение с помощью панели МКА поверхностных антигенных детерминант атипичных по агглютинабельности штаммов *Vibrio cholerae* // Проблемы особо опасных инфекций. — 2022. — № 1. — С. 77–85.
3. Крицкий А.А., Смирнова Н.И., Каляева Т.Б., Оброткина Н.Ф., Грачева И.В., Катъшев А.Д., Кутырев В.В. Сравнительный анализ молекулярно-генетических свойств нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор, изолированных в России и на эндемичных по холере территориях // Проблемы особо опасных инфекций. — 2021. — № 3. — С. 72–82.
4. Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б. ПЦР-генотипирование нетоксигенных штаммов холерных вибрионов как один из подходов их актуализации в плане эпиднадзора за холерой // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. — 2018. — № 2. — С. 28–35.
5. Левченко Д.А., Архангельская И.В., Кругликов В.Д., Подойницына О.А. Атипичность штаммов *Vibrio cholerae* O1 по признаку агглютинабельности // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2020. — № 5. — С. 482–491.
6. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Якушева О.А., Алексеева Л.П., Водопьянов С.О., Ежова М.И., Носков А.К. Изучение диапазона изменчивости по агглютинабельности штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных при мониторинговых исследованиях // Проблемы особо опасных инфекций. — 2022. — № 3. — С. 107–114.
7. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Гаевская Н.Е., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б. Фено- и генотипические особенности нетоксигенных штаммов холерных вибрионов различного происхождения, изолированных на территории России // Проблемы особо опасных инфекций. — 2020. — № 3. — С. 89–96.
8. Миронова Л.В., Бочалгин Н.О., Гладких А.С., Феранчук С.И., Пономарева А.С., Балахонов С.В. Филогенетическое положение и особенности структуры геномов *stxAB⁻tcpA⁺ Vibrio cholerae* из поверхностных водоемов на неэндемичной по холере территории // Проблемы особо опасных инфекций. — 2020. — № 1. — С. 115–123.
9. Миронова Л.В. Современные представления о закономерностях эпидемического процесса при холере: экологические и молекулярно-биологические аспекты // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2018. — Т. 23. — № 5. — С. 242–250.
10. Селянская Н.А., Егиазарян Л.А., Ежова М.И., Пасюкова Н.И., Водопьянов С.О. Анализ устойчивости к антибактериальным препаратам холерных вибрионов, выделенных из объектов окружающей среды в России в 2019 г. // Антибиотики и химиотерапия. — 2021. — Т. 66. — № 3–4. — С. 4–11.
11. Aminov R.I., Mackie R.I. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes // FEMS Microbiology Letters. — 2007. — Vol. 271. — No. 2. — P. 147–161.
12. De K., Ramamurthy T., Faruque S.M., Yamasaki S., Takeda Y., Nair G.B., Nandy R.K. Molecular characterisation of rough strains of *Vibrio cholerae* isolated from diarrhoeal cases in India and their comparison to smooth strains // FEMS Microbiol. Lett. — 2004. — Vol. 232. — No. 1. — P. 23–30.
13. Mitra R.K., Nandy R.K., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Yamasaki S., Shimada T., Takeda Y., Nair G.B. Molecular characterisation of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients with diarrhea // J. Med. Microbiol. — 2001. — Vol. 50. — No. 3. — P. 268–276.

14. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Molecular Biology and Evolution*. — 2011. — Vol. 28. — No. 10. — P. 2731–2739.

References

1. Ashmarin IP, Vorob'yev AA. Statisticheskiye metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh. Leningrad: Medgiz, 1962: 180 (in Russian).
2. Yevdokimova VV, Alekseyeva LP, Yakusheva OA, Levchenko DA, Kruglikov VD, Zyuzina VP, Yagovkin ME. Izucheniye s pomoshch'yu paneli MKA poverkhnostnykh antigennykh determinant atipichnykh po agglyutinabel'nosti shtammov *Vibrio cholerae*. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2022; 1:77–85 (in Russian).
3. Kritskiy AA, Smirnova NI, Kalyayeva TB, Obrotkina NF, Gracheva IV, Katyshev AD, Kutyrev VV. Sravnitel'nyy analiz molekulyarno-geneticheskikh svoystv netoksigenykh shtammov *Vibrio cholerae* O1 biovara El' Tor, izolirovannykh v Rossii i na endemichnykh po kholere territoriyakh. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2021; 3:72–82 (in Russian).
4. Kruglikov VD, Levchenko DA, Vodop'yanov AS, Nepomnyashchaya NB. PTSR-genotipirovaniye netoksigenykh shtammov kholernykh vibriov kak odin iz podkhodov ikh aktualizatsii v plane epidnazora za kholeroy. *Epidemiologiya i infektsionnyye bolezni. Aktual'nyye voprosy* 2018; 2:28–35 (in Russian).
5. Levchenko DA, Arkhangel'skaya IV, Kruglikov VD, Podoinitsyna OA. Atipichnost' shtammov *Vibrio cholerae* O1 po priznaku agglyutinabel'nosti. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* 2020; 5:482–491 (in Russian).
6. Levchenko DA, Kruglikov VD, Arkhangel'skaya IV, Yakusheva OA, Alekseyeva LP, Vodop'yanov SO, Yezhova MI, Noskov AK. Izucheniye diapazona izmenchivosti po agglyutinabel'nosti shtammov *Vibrio cholerae*, vydelennykh pri monitoringovykh issledovaniyakh. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2022; 3:107–114 (in Russian).
7. Levchenko DA, Kruglikov VD, Gayevskaya NYe, Vodop'yanov AS, Nepomnyashchaya NB. Fenotipicheskiye osobennosti netoksigenykh shtammov kholernykh vibriov razlichnogo proiskhozhdeniya, izolirovannykh na territorii Rossii. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2020; 3:89–96 (in Russian).
8. Mironova LV, Bochalgin NO, Gladkikh AS, Feranchuk SI, Ponomareva AS, Balakhonov SV. Filogeneticheskoye polozheniye i osobennosti struktury genomov *ctxAB⁻tcpA⁺ Vibrio cholerae* iz poverkhnostnykh vodoyemov na neendemichnoy po kholere territorii. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2020; 1:115–123 (in Russian).
9. Mironova LV. Sovremennyye predstavleniya o zakonomernostyakh epidemicheskogo protsessa pri kholere: ekologicheskiye i molekulyarno-biologicheskiye aspekty. *Epidemiologiya i infektsionnyye bolezni* 2018; 23(5):242–250 (in Russian).
10. Selyanskaya NA, Yegiazaryan LA, Yezhova MI, Pasyukova NI, Vodop'yanov SO. Analiz ustoychivosti k antibakterial'nym preparatam kholernykh vibriov, vydelennykh iz ob'yektov okruzhayushchey sredy v Rossii v 2019 g. *Antibiotiki i khimioterapiya* 2021; 66(3–4):4–11 (in Russian).
11. Aminov RI, Mackie RI. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology Letters* 2007; 271(2):147–161.
12. De K, Ramamurthy T, Faruque SM, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB, Nandy RK. Molecular characterisation of rough strains of *Vibrio cholerae* isolated from diarrhoeal cases in India and their comparison to smooth strains. *FEMS Microbiol. Lett* 2004; 232(1):23–30.
13. Mitra RK, Nandy RK, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Yamasaki S, Shimada T, Takeda Y, Nair GB. Molecular characterisation of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients with diarrhea. *J Med Microbiol* 2001; 50(3):268–276.
14. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 2011; 28(10):2731–2739.

COMPLEX CHARACTERISTICS OF VIBRIO CHOLERAЕ STRAINS – R-VARIANT

D.A. LEVCHENKO, V.D. KRUGLIKOV, O.A. PODOINITSYNA, N.B. NEPOMNYASHCHAYA, N.A. SELYANSKAYA, A.S. VODOPYANOV, M.I. YEZHOVA, M.V. RENGACH, A.K. NOSKOV

Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of the Federal Service on Consumer Rights Protection and Human Welfare Supervision Russian Federation, Rostov-on-Don

In the course of monitoring studies of environmental objects on the territory of Russia, isolates that are atypical in terms of agglutinability (R-variant) are periodically recorded against the background of the isolation of non-toxigenic strains of *Vibrio cholerae* O1 of the serogroup. The spread of antibiotic resistance of microorganisms due to mutations, genetic rearrangements occurring in bacterial

populations has been established. The aim of the work was to conduct a comparative study of the genetic organization of strains of *Vibrio cholerae* R-variant with an assessment of antibiotic resistance. We used 63 strains of *V. cholerae* R-variant, isolated from environmental protection facilities in the territories of the former USSR Republics and subjects of Russia. A subgroup of strains was established – «true R-variants», consisting of six isolates, which were agglutinated only by RO diagnostic cholera serum in a diagnostic titer. It was shown that the *mshA* gene was absent in their genome, which can be interpreted as a feature of the genetic organization of this group of strains. A population of epidemically significant strains with identical PCR genotypes was identified. The ability to be agglutinated by RO-serum is characteristic of strains with different genetic profiles. The ability of *V. cholerae* strains to agglutinate with RO-serum does not affect the group profile of antibiotic susceptibility characteristic of *V. cholerae*. The results of microbiological, molecular genetic studies revealed discrepancies in the differentiation of strains of *Cholera* vibrios R-variant according to genetic profiles and serological groups. This fact indirectly indicates the diversity of the phylogenesis of the studied strains, positioned as the R-variant of *V. cholerae*.

Keywords: *Vibrio cholerae* R-variant, monitoring, agglutinability, PCR-genotyping, antibiotic resistance.

Address:

Levchenko D.A., Ph.D.

Senior researcher, acting head laboratory of experimental biological models and biological safety, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don
E-mail: levchenko_da@antiplague.ru

Для цитирования:

Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Подойницына О.А., Непомнящая Н.Б., Селянская Н.А., Водопьянов А.С., Ежова М.И., Ренгач М.В., Носков А.К. Комплексная характеристика штаммов *Vibrio cholerae* – R-вариант. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(1):6–14.

For citation:

Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Podoinitsyna O.A., Nepomnyashchaya N.B., Selyanskaya N.A., Vodopyanov A.S., Yezhova M.I., Rengach M.V., Noskov A.K. Complex characteristics of *Vibrio cholerae* strains – R-variant. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(1):6–14 (in Russian).

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И УСЛОВИЙ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОБНОГО ПРОДУЦЕНТА БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

И.А. ГНЕУШЕВА*, А.В. ЛУШНИКОВ

ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина», Орёл

Изучена зависимость диаметра колоний микроскопического гриба *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 от состава питательных сред. Установлено пять влияющих факторов, представляющих компоненты питательной среды для культивирования микромицета. В процессе реализации эксперимента определили физиологическую зависимость диаметра колонии *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 от величины рН питательной среды. Оптимальным рН для культивирования является 7,3. Для подбора условий глубинного культивирования был реализован полный факторный эксперимент типа $N=2^k$. Пределы варьирования концентрацией выбранного источника углерода — сахарозы — определяли на основании результатов поверхностного культивирования продуцента на средах, содержащих сахарозу (г/л): СУА — 30 и NSA — 0,2. Основываясь на полученной математической модели, с целью увеличения выхода соединений, обладающих бактериостатической активностью, был реализован эксперимент по оптимизации условий культивирования *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 методом крутого восхождения. По результатам проведенных экспериментов был определен состав питательной среды и оптимизированы условия глубинного культивирования *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 для получения бактериостатических соединений: сахароза — 40,34; NaNO_3 — 2,0; KH_2PO_4 — 2,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 1,0; посевная доза инокулята микромицета 2,01 McF; продолжительность культивирования 7,78 суток ≈ 187 часов; температура 28 °С; перемешивание и аэрация на автоконтроле по $\text{pO}_2 \geq 80\%$, рН 7,4 \pm 0,2.

Ключевые слова: *Trichoderma atrobrunneum*, микробный продуцент, бактериостатические соединения, вторичные метаболиты, оптимальный состав питательной среды.

Введение

В биотехнологическом производстве биологически активных веществ микробными продуцентами особенно остро стоит проблема выбора компонентов питательной среды, оптимальных условий роста микроорганизма, подбора количества посевного инокулята для его глубинного культивирования с целью повышения биосинтетической активности [2, 6].

Для роста продуцента нужен жизнеспособный посевной материал, источники энергии и углерода, питательные вещества и соответствующие физико-химические условия культивирования [5, 7].

Для оптимизации питательных сред для микроорганизмов все чаще используют математический метод планирования экспериментов, что позволяет обоснованно

подходить к подбору компонентов питательных сред, делать их более экономичными [1, 2].

Учитывая большой практический интерес к бактериостатическим соединениям микробного происхождения и необходимость разработки совершенной технологии их получения, представляется актуальным подбор состава питательной среды и условий глубинного культивирования для грибов *Trichoderma* — продуцента антибиотических веществ [3, 4, 11]. Среди представителей рода *Trichoderma* spp. установлены продуценты новых мембранно-активных пептидов — пептаиолов (триховиринов, трихорзинов, сузуказилинов и др.), позволяющих преодолеть антибиотикорезистентность микробных возбудителей [9, 12]. Низкомолекулярные соединения *Trichoderma* spp. также проявляют антимикробную активность в отношении многих патогенных микроорганизмов [8, 10].

Исходя из вышесказанного, целью настоящего исследования являлся подбор оптимального состава питательной среды и условий глубинного культивирования микробного продуцента бактериостатических соединений *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 с целью увеличения его биосинтетической активности.

© 2023 г. Гнеушева И.А., Лушников А.В.

* **Автор для переписки:**

Гнеушева Ирина Алексеевна
кандидат технических наук, доцент кафедры биотехнологии,
ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет
имени Н.В. Парахина
E-mail: ia.gneusheva@orelsau.ru

Материалы и методы

Объект исследования — штамм микроскопического гриба *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434, выделенный из почвы, а в дальнейшем существенно модифицированный и улучшенный с помощью традиционных методов отбора штамма.

Исследуемый штамм представляет собой наиболее перспективный вариант культуры продуцента, который синтезирует в жидкую ферментационную среду при глубинном культивировании биологически активные соединения, обладающие антигрибной и антибактериальной активностью (патент РФ 2710783 «Штамм *Trichoderma atrobrunneum*, обладающий антибактериальной активностью в отношении *Bacillus anthracis*», 2020 г.).

Определение оптимального состава питательной среды для глубинного культивирования предусматривало реализацию следующих этапов эксперимента: 1 — подбор среды для поверхностного культивирования; 2 — исключаящий эксперимент для выявления наиболее значимых факторов для роста культуры.

Зависимость роста мицелиального гриба от состава среды оценивали по диаметру колоний на 5–7-е сутки культивирования при поверхностном культивировании на плотных питательных средах. Для удовлетворения физиологических потребностей продуцента в отсеивающий эксперимент были включены компоненты часто используемых универсальных питательных сред для культивирования грибов: SDA «Сабуро агар» (гидролизат казеина – 5,0, пептон – 5,0,

глюкоза – 20,0; рН (при 25 °С) 5,7±0,2), СУА «Чапека агар» (сахароза – 30,0; NaNO₃ – 2,0; KH₂PO₄ – 1,0; MgSO₄×7H₂O – 0,5; KCl – 0,5; FeSO₄ – 0,01, рН (при 25 °С) 7,3±0,2), PDA «картофельно-декстрозный агар» (глюкоза – 20,0; рН 5,6±0,2), NSA «обедненный синтетический агар» (KH₂PO₄ – 1,0; KNO₃ – 1,0; MgSO₄×7H₂O – 0,5; KCl – 0,5; глюкоза – 0,2; сахароза – 0,2; агар – 20,0; рН 5,5), WA «сусло агар» (NH₄Cl – 1,0; агар – 15,0; K₂HPO₄×3H₂O – 1,0; солодовый экстракт – 15,0; пептон – 0,75, декстрин – 2,75; D-мальтоза – 12,75; рН 4,8±0,2 (при 25 °С), согласно общепринятым рецептурам.

Компоненты питательной среды, отобранные для проведения отсеивающего эксперимента, и их концентрации.

Отсеивающий эксперимент проводили на основании матрицы, включающей в себя одновременно 15 факторов, являющихся рецептурными компонентами всех использованных ранее питательных сред, с исключением KCl, так как ионы K⁺ и Cl⁻ уже представлены в составе соединений, вошедших в матрицу и их нельзя заменить оставшимися компонентами.

Факторы были распределены в 4 группы, представляющие собой: источники углерода – X₁₋₆; источники азота – X₇₋₁₁; источники фосфора – X_{12,13}; источники серы – X_{14,15}. Для каждой группы формировали индивидуальный план по правилам полного факторного эксперимента, затем случайно комбинировали строки и получали готовую матрицу для реализации эксперимента *in vitro* (табл. 1).

Таблица 1

Расширенная матрица планирования эксперимента

№	X ₁	X ₇	X ₁₂	X ₁₄	по группам				Условия эксперимента														
	X ₂	X ₈	X ₁₃	X ₁₅	I	II	III	IV	I					II					III		IV		
	X ₃	X ₉							X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅
1	-1	-1	-1	-1	4	7	5	9	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1	7	7	8	4	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	1	-1
3	-1	1	-1	-1	5	6	11	12	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1
4	1	1	-1	-1	9	7	2	8	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1
5	-1	-1	1	-1	7	15	6	6	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1
6	1	-1	1	-1	10	7	9	9	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1
7	1	-1	-1	1	8	7	5	7	1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1
8	1	1	1	-1	7	6	10	8	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1
9	-1	-1	-1	1	11	6	5	8	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1
10	1	-1	-1	1	6	9	6	3	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1
11	-1	1	-1	1	8	5	4	5	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
12	1	1	-1	1	7	6	9	6	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1	8	7	7	8	1	1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1
14	1	-1	1	1	8	7	16	7	1	1	1	-1	1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1
15	-1	1	1	1	14	10	8	9	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
16	1	1	1	1	9	9	5	13	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1

Стремясь к снижению трудоемкости эксперимента и стараясь избежать возможной маскировки одного компонента питательной среды другим, нижний уровень принимали за ноль, верхние уровни соответствуют навеске в стандартной рецептуре.

Если фактор влияет на выходной параметр y_i , то при переходе его с одного уровня на другой произойдет смещение центра распределения. Вклад фактора оценивали с помощью разницы медиан для нижнего и верхнего уровня. Числовое значение коэффициентов определяли как разность средних значений отклика, соответствующих верхнему и нижнему уровням фактора:

$$b_i = \frac{\sum \bar{Y}_{x_i^+}}{N_{(x_i^+)}} - \frac{\sum \bar{Y}_{x_i^-}}{N_{(x_i^-)}}$$

Корректировку экспериментальных данных проводили только по нижнему уровню варьирования факторов, выбирали значения отклика функции \bar{y}_i , которые соответствуют уровню этих факторов:

$$S_y^2 = \frac{1}{N(m-1)} \sum_{i=1}^m (y_i - \bar{y}_i)^2$$

Дисперсию воспроизводимости среднего значения $S_{\bar{y}}^2$ определяли на основании постановки серии из 9 параллельных опытов со значениями X_j^0 . Значение рассчитывали по формуле:

$$S_{\bar{y}}^2 = \frac{1}{(m-1)} \sum_{i=1}^m (y_{0i} - \bar{y}_{0i})^2 = 9,69$$

Оценку соизмеримости производили по критерию Фишера.

Процедуру корректировки отклика останавливали при исключении всех влияющих факторов, то есть достижении значения дисперсии воспроизводимости, соизмеримого дисперсии среднего значения отклика функции:

$$F_{\text{расч}} = \frac{S_y^2}{S_{\bar{y}_0}^2}; F_{\text{табл}}(0,95;3;16)=3,24$$

Для подбора условий глубинного культивирования был реализован полный факторный эксперимент типа $N=2^k$ (табл. 2). Матрица планирования полного факторного эксперимента по типу $N=2^k$ представлена в таблице 3.

Таблица 2

Полный факторный эксперимент для подбора условий глубинного культивирования

k	N	m	ρ
число факторов	число опытов	параллельные опыты	доверительная вероятность
3	8	9	0,95

Таблица 3

Матрица планирования полного факторного эксперимента по типу $N=2^k$

№	Фактор							
	X_0	X_1	X_2	X_3	X_1X_2	X_1X_3	X_2X_3	$X_1X_2X_3$
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1	1

Результаты и обсуждение

Подбор состава питательной среды. Оптимизация условий культивирования может осуществляться на основе сочетания экспериментального и математического моделирования с проведением вычислительного эксперимента, который содержит важный этап — определение математической модели, то есть урав-

нения регрессии, характеризующего связь параметра оптимизации с основными факторами. Использование такой упрощенной модели позволяет быстрее сделать необходимые выводы о значимости тех или иных компонентов питательной среды, качественном и количественном ее составе.

На первом этапе исследования изучена зависимость диаметра колоний микроскопического гриба

Trichoderma atrobrunneum ВКПМ F-1434 от состава питательных сред (табл. 4).

Так как экспериментальное значение критерия Кохрена не превышает табличного значения, подтвержда-

ется гипотеза об однородности дисперсий; следовательно, опыты считаются воспроизводимыми. В дальнейшем нами была проведена корректировка отклика функции по коэффициентам влияющих факторов (табл. 5).

Таблица 4

Зависимость диаметра колоний *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 от состава питательных сред

№	\bar{y}_i	σ	$S^2_{\bar{y}_i}$	$G_{расч}$	$G_{табл}$
1	29,57	1,01	1,01	0,20	0,26
2	36,43	1,06	1,12		
3	30,00	2,40	5,77		
4	37,14	0,45	0,20		
5	21,29	2,52	6,37		
6	36,12	0,95	0,90		
7	41,71	0,46	0,21		
8	35,96	0,21	0,04		
9	34,82	0,95	0,90		
10	31,05	1,07	1,14		
11	26,99	1,27	1,62		
12	28,37	1,69	2,84		
13	35,59	1,14	1,29		
14	36,10	1,65	2,73		
15	34,60	1,57	2,47		
16	35,80	1,74	3,02		

Таблица 5

Корректировка значений отклика функции по коэффициентам влияющих факторов

№	\bar{y}_i	Корректировка \bar{y}_i		
		1 раунд	2 раунд	3 раунд
1	29,57	16,84	16,84	22,30
2	36,43	23,70	23,70	29,16
3	30,00	17,27	24,91	28,40
4	37,14	24,41	27,56	29,53
5	21,29	27,21	27,21	27,21
6	36,12	23,39	26,54	32,00
7	41,71	28,98	28,98	34,44
8	35,96	23,23	30,87	30,87
9	34,82	22,09	26,58	26,58
10	31,05	24,24	24,24	29,70
11	26,99	20,18	27,82	27,82
12	28,37	15,64	23,28	23,23
13	35,59	22,86	26,01	27,98
14	36,10	23,37	23,37	28,83
15	34,60	21,87	21,81	27,27
16	35,80	28,99	28,99	30,96
S^2_y	24,78	15,19	11,43	9,07

$$F_{расч} = \frac{9,07}{9,69} = 0,94; F_{расч} \leq F_{табл}$$

В третьем раунде корректировки получаем дисперсию воспроизводимости 9,07, что составляет 0,94

от дисперсии воспроизводимости среднего, что можно признать соизмеримой величиной и остановить корректировку отклика.

Для исключения парного взаимодействия факторов строили диаграммы рассеивания (рис. 1).

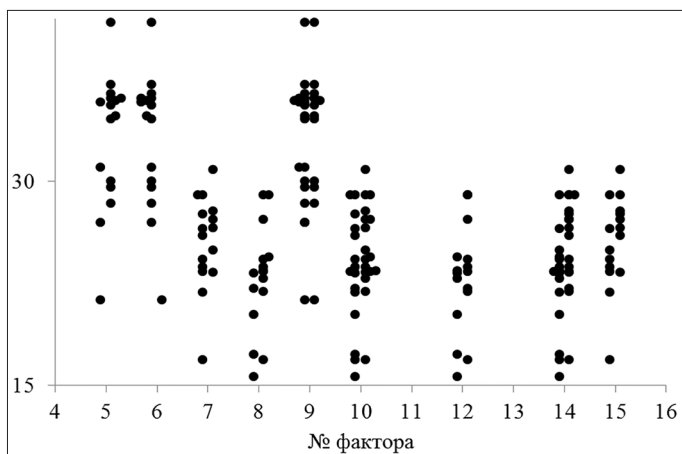


Рис. 1. Парное взаимодействие факторов эксперимента

На рисунке 1 показано, что при построении диаграмм парного взаимодействия факторов (№ 9 – 5/6; № 10 – 7/8; № 14 – 12/15) в факторе № 10 определяется появление точки нового уровня, что свидетельствует о наличии парного взаимодействия факторов 7 и 8.

Ввиду того, что оба фактора являются источниками N_2 и альтернативы им нет, то полного исключения их из состава допускать нельзя. Так как ионы K^+ уже представлены в составе фосфатной соли, то было принято решение оставить в среде $NaNO_3$.

В совокупности всех проведенных манипуляций получили 5 значимых коэффициентов (табл. 6). Так как модуль их расчетного значения больше произведения дисперсии коэффициентов и критерия Стьюдента ($S_b \cdot t = 1,28$), подтверждается гипотеза об их отличии от нуля.

Таблица 6

Регрессионные коэффициенты влияющих факторов

b_5	b_6	b_8	b_{12}	b_{15}
-5,92	12,73	-4,49	-3,15	-3,49

Таким образом, установлено 5 влияющих факторов, представляющих компоненты питательной среды для культивирования *Trichoderma atroviride* ВКПМ F-1434 (табл. 7).

Таблица 7

Компоненты питательной среды для культивирования *Trichoderma atroviride* ВКПМ F-1434

№ фактора	Наименование	Навеска, г/л
5	Глюкоза	20,0
6	Сахароза	30,0
8	$NaNO_3$	2,0
12	KH_2PO_4	2,0
15	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,0

В процессе реализации эксперимента определили физиологическую зависимость диаметра колонии *Trichoderma atroviride* ВКПМ F-1434 от величины рН питательной среды. Наиболее обильный, быстрый рост микромицета соответствует самому высокому значению рН (из представленного набора сред) и уменьшается по мере закисления среды (рис. 2). Таким образом, исходя из полученных данных, оптимальным рН для культивирования является 7,3.

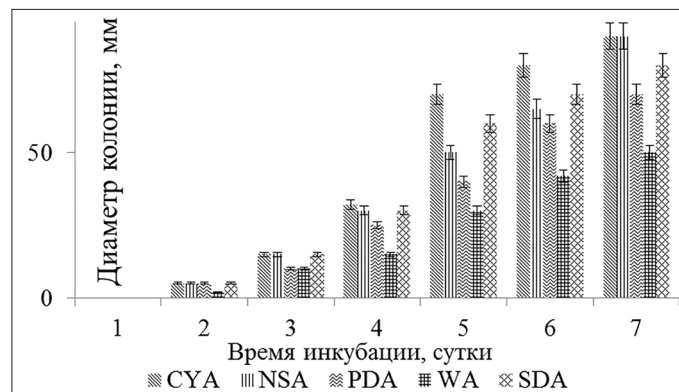


Рис. 2. Рост *Trichoderma atroviride* ВКПМ F-1434 на различных питательных средах

На среде CYA гриб растет очень быстро – $14,0 \pm 5$ мм за сутки инкубирования, краев чашки Петри (90 мм) достигает на седьмой день. Мицелий белого цвета до 2 мм в высоту, образование конидий обильное, концентрическими зонами.

На среде NSA микромицет вырастает до 90,0 мм за 7 суток. Воздушный мицелий практически отсутствует, образование конидий среднее.

На среде WA рост до $50,0 \pm 5$ мм на 7-е сутки культивирования. К 10 суткам зарастает вся чашка Петри. Мицелий средний, спороношение среднее.

На среде PDA микроорганизм вырастает до 60,0 мм за 7 суток. Мицелий до 1 мм в высоту, спороношение обильное.

На среде Сабуро рост быстрый, обильный – 80,0 мм на 7-е сутки, мицелий до 2 мм в высоту, спороношение среднее.

Определение математической модели процесса глубинного культивирования. Для подбора условий глубинного культивирования был реализован полный факторный эксперимент типа $N=2^k$ (табл. 8).

Посевную дозу продуцента варьировали в пределах, позволяющих четко дифференцировать все стадии роста, для чего воспользовались стандартной методикой определения чувствительности к АБП и/или идентификации по биохимическим свойствам: от 1 до 2 единиц мутности по McFarland.

Таблица 8

Распределение уровней факторов варьирования

Уровень	Фактор		
	x_1	x_2	x_3
	Посевная доза, ед. мутности МсF	Продолжительность культивирования, сут.	Сахароза, г/л
x_j^{min}	1	1	15
x_j^{max}	2	7	30
x_j^0	1,5	4	22,5
Δx_j	0,5	3	7,5

Продолжительность культивирования варьировали в пределах от времени истощения источника углерода, рассчитанного при максимальной скорости утилизации $0,82 \text{ г/ч}\times\lambda$ ($V_m = 4,013 \times 10^{-4}$ моль/мин $\times\lambda$; M_r сахарозы $342,3 \text{ г/моль}$) до появления спор [3].

Пределы варьирования концентрацией выбранного источника углерода – сахарозы – определяли на

основании результатов поверхностного культивирования продуцента на средах, содержащих сахарозу (г/л): СYA – 30 и NSA – 0,2 [5]. При различии концентрации единственного источника углерода в 150 раз была установлена относительно одинаковая скорость роста продуцента на плотной питательной среде. Для сокращения столь значимого различия нижним уровнем было принято среднее округленное значение рецептурных навесок сахарозы в двух средах.

Культивировали продуцент при температуре $28 \text{ }^\circ\text{C}$ [3], перемешивание ($150\text{--}250 \text{ об}^{-1}$) и аэрация (100%, 0,5 бар) контролировались программой ферментера автоматически, поддерживая $pO_2 \geq 80\%$, pH контролировали автоматически, поддерживая диапазон $7,4 \pm 0,2$.

Зависимость диаметра зоны угнетения роста тест-культуры от условий глубинного культивирования *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 представлена в таблице 9.

Таблица 9

Зависимость диаметра зоны угнетения роста тест-культуры от условий глубинного культивирования *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434

№	Отклик					
	\bar{y}_j , мм	σ	S^2_j	$G_{расч}$	$G_{табл}$	S^2_y
1	21,89	1,05	1,11	0,38	0,43	10,91
2	19,78	1,30	1,69			
3	18,56	1,33	1,78			
4	16,56	3,09	9,53			
5	14,22	1,79	3,19			
6	14,11	1,36	1,86			
7	13,33	1,73	3,00			
8	13,11	1,76	3,11			

В связи с тем, что экспериментальное значение критерия Кохрена также не превышает табличного значения, подтверждается гипотеза об однородности дисперсий; следовательно, опыты считаются воспроизводимыми.

Коэффициенты при факторах и их взаимодействиях статистически незначимы, так как модуль их расчетного значения меньше произведения дисперсии коэффициентов и критерия Стьюдента (табл. 10).

Таблица 10

Определение коэффициентов регрессии и оценка их значимости

Коэффициенты		S^2_b	S_b	f_2	$t_{табл}$	Δb_j
b_0	16,44	1,36	1,17	64	1,67	1,95
b_1	-0,56					
b_2	-1,06					
b_3	-1,75					
b_{12}	0,00					
b_{13}	0,47					
b_{23}	0,58					
b_{123}	-0,03					

Статистическая незначимость коэффициентов может быть вызвана близостью уровня базового режима факторов или их взаимодействий к точке частного экстремума, то есть находится в почти стационарной области.

Для получения модели второго порядка и ее анализа был реализован факторный эксперимент по центральному композиционному ортогональному плану (табл. 11).

Таблица 11

Матрица центрального композиционного ортогонального плана (ЦКОП)

Группы точек	№	Фактор										
		X ₀	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ X ₂	X ₁ X ₃	X ₂ X ₃	X ₁ X ₂ X ₃	X ₁ ²	X ₂ ²	X ₃ ²
N _{ПФЭ}	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	1
	2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1
	3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1	1
	4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
	5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	1
	6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1	1
	7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	1	1	1
	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
N _α	9	1	-α	0	0	0	0	0	0	-α ²	0	0
	10	1	α	0	0	0	0	0	0	α ²	0	0
	11	1	0	-α	0	0	0	0	0	0	-α ²	0
	12	1	0	α	0	0	0	0	0	0	α ²	0
	13	1	0	0	-α	0	0	0	0	0	0	-α ²
	14	1	0	0	α	0	0	0	0	0	0	α ²
N ₀	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Результаты экспериментов центрального композиционного ортогонального плана (ЦКОП) представлены в таблице 12.

Таблица 12

Результаты экспериментов центрального композиционного ортогонального плана (ЦКОП)

	\bar{y}_i	σ	S _i ²	G _{расч}	G _{табл}	S _y ²
1	21,89	1,05	1,11	0,26	0,27	13,71
2	19,78	1,30	1,69			
3	18,56	1,33	1,78			
4	16,56	3,09	9,53			
5	14,22	1,79	3,19			
6	14,11	1,36	1,86			
7	13,33	1,73	3,00			
8	13,11	1,76	3,11			
9	20,67	1,22	1,50			
10	10,22	1,09	1,19			
11	19,11	1,17	1,36			
12	10,44	1,01	1,03			
13	15,44	1,13	1,28			
14	12,11	1,76	3,11			
15	13,56	1,13	1,28			

Также нами показано, что экспериментальное значение критерия Кохрена не превышает табличного значения, то есть подтверждается гипотеза об однородности дисперсий; следовательно, опыты считаются воспроизводимыми.

Выделенные коэффициенты регрессии (табл. 13) значимы, поскольку модуль их расчетного значения больше произведения дисперсии данной группы коэффициентов и критерия Стьюдента.

Таблица 13

Определение коэффициентов регрессии и оценка их значимости

Коэффициенты	S _b ²	S _b	f ₂	t _{табл}	Δb _i			
b ₀	219,56	13,14	3,62	64	6,05			
b ₁	-1,56	0,14	0,37			1,67	0,62	
b ₂	-1,73							
b ₃	-2,38							
b ₁₂	0,00							
b ₁₃	0,47							
b ₂₃	0,58							
b ₁₂₃	-0,03	0,19	0,44		0,73			
b ₁₁	0,56							
b ₂₂	0,40							
b ₃₃	0,16							
	24,44						4,94	8,25

Уравнение регрессии

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2$$

получило вид: $\bar{y} = 219,56 - 1,56X_1 - 1,73X_2 - 2,38X_3$.

В таблице 14 представлены параметры моделирования и оценка адекватности модели центрального композиционного ортогонального плана (ЦКОП).

Таблица 14

Параметры моделирования и оценка адекватности модели центрального композиционного ортогонального плана (ЦКОП)

№	\bar{y}_i	B	f ₁	S _a ²	F _{расч}	F _{табл}
1	56,31	4	99	18,09	1,32	1,47
2	20,23					
3	20,18					
4	19,81					
5	19,97					
6	19,78					
7	19,77					
8	19,56					
9	20,13					
10	19,79					
11	20,13					
12	19,75					
13	20,17					
14	19,64					
15	-0,07					

Экспериментальное значение критерия Фишера меньше табличного значения — модель адекватно описывает исследуемый процесс и эти параметры, быть может, можно использовать для оптимизации процесса.

Оптимизация культивирования микробного продуцента бактериостатических соединений методом крутого восхождения. В таблице 15 представлен расчет крутого восхождения.

Таблица 15

Расчет крутого восхождения

Уровень	Фактор		
	x_1	x_2	x_3
Нижний, x_j^{\min}	1	1	15
Верхний, x_j^{\max}	2	7	30
Базовый, x_j^0	1,5	4	22,5
Интервал, Δx_j	0,5	3	7,5
Коэффициенты, b_j	-1,56	-1,73	-2,38
Пропорциональность, θ	0,66	0,73	1
Шаг по градиенту, δx	0,51	3,78	17,84

Основываясь на полученной математической модели, с целью увеличения выхода соединений, обладающих бактериостатической активностью, был реализован эксперимент по оптимизации условий культивирования *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 методом крутого восхождения (табл. 16).

Таблица 16

Зависимость диаметра зоны угнетения роста тест-культуры от условий глубинного культивирования *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 после оптимизации

№	Опыт	Факторы			Отклик		
		x_1	x_2	x_3	$\bar{y}_{\text{мысл}}, \text{ мм}$	$\bar{y}_{\text{реал}}, \text{ мм}$	σ
1	x_j^1	2,01	7,78	40,34	26,75	22,11	1,27
2	x_j^2	2,53	11,57	58,17	14,31	19,22	1,20
3	x_j^3	3,04	15,35	76,01	1,86	-	-

На основании проведенных исследований можно заключить, что крутое восхождение в данном случае оказалось эффективным, так как, сравнивая наилучший результат ЦКОП 21,89 мм с полученным в реализованном опыте x_j^1 22,11 мм, что диаметр зоны угнетения роста тест-культуры увеличивается на 0,59%.

Заключение

По результатам проведенных экспериментов был определен состав питательной среды и оптимизированы условия глубинного культивирования *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 для получения бактериостатических соединений (г/л): сахароза — 40,34; NaNO_3 — 2,0; KH_2PO_4 — 2,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 1,0; посевная доза инокулята микромицета — 2,01 МсФ; продолжительность культивирования — 7,78 суток \approx 187 часов; температура — 28 °С; перемешивание и аэрация на автоконтроле по $\rho\text{O}_2 \geq 80\%$, pH 7,4 \pm 0,2.

Литература

1. Арзамасцев А.А., Андреев А.А. Математические модели кинетики микробного синтеза: возможности использования и новые подходы к разработке // Вестн. Тамбов. ун-та. Серия: Естеств. и техн. науки. — 2000. — Т. 5. — № 1. — С. 111–130.
2. Гнеушева И.А., Лушников А.В., Павловская Н.Е. и др. Математическое обоснование оптимального роста *Trichoderma atrobrunneum* на питательной среде с различными углеводными компонентами // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2018. — Т. 14. — № 3. — С. 13–18.
3. Гнеушева И.А., Павловская Н.Е., Лушников А.В., Маркина О.А. Определение оптимальной среды и условий глубинного культивирования продуцента бактериостатических метаболитов *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2019. — Т. 15. — № 1. — С. 10–16.
4. Куварина А.Е., Кураков А.В., Садыкова В.С. и др. Нерибосомальные пептиды грибов: биологическая активность и их перспективы в медицине // Проблемы медицинской микологии. — 2016. — Т. 18. — № 3. — С. 36–41.
5. Лушников А.В., Гнеушева И.А., Солохина И.Ю. Кинетические характеристики расщепления сахаразы в экстракте биомассы *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2020. — Т. 16. — № 3. — С. 31–35.
6. Павловская Н.Е., Гнеушева И.А., Маркина О.А. и др. Перспективы применения мицелиальных грибов *Trichoderma* spp. в зоотехнии и ветеринарной медицине // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. — 2016. — № 12. — С. 87–91.
7. Садыкова В.С., Кураков А.В., Коршун В.А. и др. Анти-микробная активность веществ, продуцируемых штаммом *T. citrinoviride* ВКПМ F-1228: оптимизация лабораторного культивирования и спектр действия индивидуальных пептабиологов // Антибиотики и химиотерапия. — 2015. — Т. 60. — № 11–12. — С. 3–8.

8. Садыкова В.С., Кураков А.В., Коршун В.А. и др. Антифунгальная активность штамма *T. citrinoviride* ВКПМ F-1228 — продуцента пептаиболов в условиях жидкофазного и твердофазного культивирования // Успехи медицинской микологии. — 2016. — Т. 16. — С. 164–166.
9. Садыкова В.С., Кураков А.В., Коршун В.А. и др. Образование штаммом *Trichoderma citrinoviride* ТУВИ 4/11 антибиотиков-пептаиболов // Проблемы медицинской микологии. — 2015. — Т. 17. — № 1. — С. 41–46.
10. Садыкова В.С., Кураков А.В., Куварина Е.А. и др. Антимикробная активность штаммов грибов рода *Trichoderma* из Средней Сибири // Прикладная биохимия и микробиология. — 2015. — Т. 51. — № 3. — С. 1–9.
11. Mukherjee P.K., Horwitz B.A., Kenerley C.M. Secondary metabolism in *Trichoderma* — a genomic perspective // Microbiology. — 2012. — Vol. 158. — Pt. 1. — P. 35–45.
12. Szekeres A., Leitgeb B., Kredics L., et al. Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma* // Acta Microbiol Immunol Hung. — 2005. — Vol. 52. — P. 137–168.
4. Kuvarina AYe, Kurakov AV, Sadykova VS i dr. Neribosomal'nyye peptidy gribov: biologicheskaya aktivnost' i ikh perspektivy v meditsine. Problemy meditsinskoj mikologii 2016; 18(3):36–41 (in Russian).
5. Lushnikov AV, Gneusheva IA, Solokhina IYu. Kineticheskiye kharakteristiki rasshchepeniya sakharazy v ekstrakte biomassy *Trichoderma atrobrunneum* VKPM F-1434. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova 2020; 16(3):31–35 (in Russian).
6. Pavlovskaya NYe, Gneusheva IA, Markina OA i dr. Perspektivy primeneniya mitselial'nykh gribov *Trichoderma* spp. v zootekhonii i veterinarnoy meditsiny. Veterinariya, zootekhniya i biotekhnologiya 2016; 12:87–91 (in Russian).
7. Sadykova VS, Kurakov AV, Korshun VA i dr. Antimikrobnaya aktivnost' veshchestv, produksiruyemykh shtammom *T. citrinoviride* VKPM F-1228: optimizatsiya laboratornogo kul'tivirovaniya i spektr deystviya individual'nykh peptaibolov. Antibiotiki i khimioterapiya 2015; 60(11–12):3–8 (in Russian).
8. Sadykova VS, Kurakov AV, Korshun VA i dr. Antifungal'naya aktivnost' shtamma *T. citrinoviride* VKPM F-1228 — produsenta peptaibolov v usloviyakh zhidkofaznogo i tverdogfaznogo kul'tivirovaniya. Uspekhi meditsinskoj mikologii 2016; 16:164–166 (in Russian).
9. Sadykova VS, Kurakov AV, Korshun VA i dr. Obrazovaniye shtammom *Trichoderma citrinoviride* TYVI 4/11 antibiotikov-peptaibolov. Problemy meditsinskoj mikologii 2015; 17(1):41–46 (in Russian).
10. Sadykova VS, Kurakov AV, Kuvarina YeA i dr. Antimikrobnaya aktivnost' shtammov gribov roda *Trichoderma* iz Sredney Sibiri. Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya 2015; 51(3):1–9 (in Russian).
11. Mukherjee PK, Horwitz BA, Kenerley CM. Secondary metabolism in *Trichoderma* — a genomic perspective. Microbiology 2012; 158(Pt 1):35–45.
12. Szekeres A, Leitgeb B, Kredics L, et al. Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*. Acta Microbiol Immunol Hung 2005; 52:137–168.

References

1. Arzamastsev AA, Andreyev AA. Matematicheskiye modeli kinetiki mikrobnogo sinteza: vozmozhnosti ispol'zovaniya i novyye podkhody k razrabotke. Vestn Tambov un-ta. Seriya: Yestestv i tekhn nauki 2000; 5(1):111–130 (in Russian).
2. Gneusheva IA, Lushnikov AV, Pavlovskaya NYe i dr. Matematicheskoye obosnovaniye optimal'nogo rosta *Trichoderma atrobrunneum* na pitatel'noy srede s razlichnymi uglevodnymi komponentami. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii imeni YuA Ovchinnikova 2018; 14(3):13–18 (in Russian).
3. Gneusheva IA, Pavlovskaya NYe, Lushnikov AV, Markina OA. Opredeleniye optimal'noy sredy i usloviy glubinnogo kul'tivirovaniya produsenta bakteriostaticheskikh metabolitov *Trichoderma atrobrunneum* VKPM F-1434. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii imeni YuA Ovchinnikova 2019; 15(1):10–16 (in Russian).

SELECTION OF THE OPTIMAL COMPOSITION OF THE NUTRITIONAL MEDIUM AND CONDITIONS FOR DEEP CULTIVATION OF A MICROBIAL PRODUCER OF BACTERIOSTATIC COMPOUNDS

I.A. GNEUSHEVA, A.V. LUSHNIKOV

Oryol State Agrarian University named after N.V. Parakhina, Orel

The dependence of the diameter of colonies of the microscopic fungus of the genus *Trichoderma atrobrunneum* VKPM F-1434 on the composition of nutrient media was studied. 5 influencing factors representing the components of the nutrient medium for cultivating micromycetes have been established. During the implementation of the experiment, the physiological dependence of the diameter of

the *Trichoderma atrobrunneum* VKPM F-1434 colony on the pH value of the nutrient medium was determined. The optimum pH for cultivation is 7.3. To select the conditions for deep cultivation, a complete factorial experiment of the type $N=2^k$ was implemented. The limits of variation by the concentration of the selected carbon source – sucrose, determined on the basis of the results of surface cultivation of the producer on media containing sucrose (g/l): CYA – 30 and NSA – 0.2. Based on the obtained mathematical model, in order to increase the yield of compounds with bacteriostatic activity, an experiment was carried out to optimize the conditions for cultivating *Trichoderma atrobrunneum* VKPM F-1434 using the steep ascent method. Based on the results of the experiments, the composition of the nutrient medium was determined and the conditions for deep cultivation of *Trichoderma atrobrunneum* VKPM F-1434 were optimized to obtain bacteriostatic compounds: sucrose – 40.34; NaNO_3 – 2.0; KH_2PO_4 – 2.0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1.0; seed dose of micromycete inoculum 2.01 McF; cultivation duration 7.78 days ≈ 187 hours; temperature 28 °C; mixing and aeration on automatic control for $\rho\text{O}_2 \geq 80\%$, pH 7.4 ± 0.2 .

Keywords: *Trichoderma atrobrunneum*, microbial producer, bacteriostatic compounds, secondary metabolites, optimal nutrient medium composition.

Address:

Gneusheva I.A., Ph.D.

Associate professor of the department of biotechnology,

Oryol State Agrarian University named after N.V. Parakhina

E-mail: ia.gneusheva@orelsau.ru

Для цитирования:

Гнеушева И.А., Лушников А.В. Подбор оптимального состава питательной среды и условий глубинного культивирования микробного продуцента бактериостатических соединений. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(1):15–24.

For citation:

Gneusheva I.A., Lushnikov A.V. Selection of the optimal composition of the nutritional medium and conditions for deep cultivation of a microbial producer of bacteriostatic compounds. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(1):15–24 (in Russian).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *ctxA* ШТАММА *VIBRIO CHOLERAE* 569В В ПРОЦЕССЕ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕТОДАМИ ОТ-ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ И ЦИФРОВОЙ КАПЕЛЬНОЙ ПЦР

А.В. ГАЕВА^{1*}, С.А. ВОРОБЬЕВА¹, О.С. ДУРАКОВА¹, О.В. ГРОМОВА¹,
А.А. КРИЦКИЙ², Л.Ф. ЛИВАНОВА¹, О.А. ВОЛОХ¹

¹ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов;

²ООО «Биотехнологический кампус», Москва

При производстве холерной химической вакцины контроль продукции основных иммуногенов их качественная и количественная характеристика проводится также на этапе культивирования. Для определения уровня экспрессии гена *ctxA*, ответственного за синтез холерного токсина (ХТ), в бульонной культуре производственного штамма *Vibrio cholerae* 569В при глубинном культивировании использовали современные молекулярно-генетические методы. Результаты, полученные как методом ОТ-ПЦР, так и методом цифровой капельной ПЦР, свидетельствуют об опережении экспрессии гена *ctxA* на 1–2 часа по сравнению с приростом биомассы и регистрируемым выходом ХТ в культуральную жидкость. Определение уровня экспрессии генов, ответственных за синтез протективных антигенов, входящих в состав вакцин, на этапе культивирования производственных штаммов-продуцентов позволит оптимизировать условия культивирования и, как следствие, увеличить выход необходимого антигенного компонента вакцины.

Ключевые слова: холерная вакцина; экспрессия гена; цифровая капельная ПЦР.

Введение

Холера — особо опасная инфекционная болезнь с диарейным синдромом, фекально-оральным механизмом передачи возбудителя инфекции, водным, пищевым и контактным путями распространения.

В связи с эпидемической ситуацией по холере в России и в мире специфическая профилактика этого заболевания необходима, поэтому разработка и усовершенствование современных безопасных химических вакцин против холеры является важным и перспективным направлением научных исследований [7].

Безопасность вакцин оценивается системой из пяти уровней контроля, один из которых — контроль качества вакцин на предприятии-изготовителе, предусматривает

обязательный поэтапный контроль материала на безопасность на разных стадиях технологического процесса (контроль исходного сырья, полуфабриката, готовой продукции) [2].

Совершенствование методов контроля компонентов вакцин на всех этапах производства — актуальная задача, для решения которой целесообразно использовать современные методы исследования.

В Российской Федерации зарегистрирована и выпускается вакцина холерная бивалентная химическая (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора). Одним из штаммов, используемых на производстве, является токсигенный штамм *Vibrio cholerae* 569В классического биовара серовара Инаба. При производстве холерной химической вакцины обязательным этапом контроля служит качественная и количественная характеристика содержания холерного токсина (ХТ) в бульонной культуре производственного штамма при глубинном культивировании. По данному показателю оценивают возможность дальнейшего проведения производственного цикла. Контроль активности холерного токсина на этапах выращивания данного штамма, согласно нормативно-технической документации, проводится

© 2023 г. Гаева А.В., Воробьева С.А., Дуракова О.С., Громова О.В., Крицкий А.А., Ливанова Л.Ф., Волох О.А.

* Автор для переписки:

Гаева Анна Вячеславовна

канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории холерных вакцин, ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

E-mail: rusrapi@microbe.ru

in vivo в кожной пробе по Крейгу и иммунохимическим методом пассивного иммунного гемолиза (РПИГ). Ранее нами показана возможность определения активности ХТ с использованием перевиваемой клеточной линии СНО-К1 [1].

Анализ экспрессии генов — это один из наиболее часто используемых методов в современной биологии. Он может быть выполнен с помощью ПЦР в реальном времени, технологии секвенирования следующего поколения, анализов на основе микрочипов или гибридизации. Существует две стратегии количественной оценки целевых молекул ДНК: относительная и абсолютная количественные оценки. Относительная количественная оценка основана на сравнении количества изучаемого гена с количеством эталонного гена. В случае абсолютной количественной оценки во время анализа необходимо использовать стандартную кривую, и количество целевой ДНК сравнивается со стандартами ДНК. Одним из наиболее распространенных методов количественного учета экспрессии генов (количественном определении транскриптов) является метод обратной транскрипции с последующим проведением полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) [13]. Экспрессия гена оценивается по количеству молекул кДНК, полученных в результате обратной транскрипции из молекул РНК исследуемого гена, относительно ПЦР-стандартов с установленной концентрацией. Для повышения точности полученных результатов окончательная оценка уровня экспрессии генов осуществляется методом 2–ΔΔСТ, который учитывает уровень экспрессии гена «домашнего хозяйства», считающийся постоянным [6, 12].

Метод цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) был разработан для точного определения количества целевых последовательностей нуклеиновых кислот без использования стандартных кривых [5, 9, 11]. Основа этой революционной технологии количественной оценки заключается в фрагментации образца на эмульсионные микрокапли на базе воды и масла и амплификации в каждой отдельной капле. Цифровая капельная ПЦР определяет абсолютную экспрессию генов без необходимости в стандартной кривой, калибраторе или эталонном гене, в то время как обычная стандартная кривая qPCR обеспечивает кратное изменение целевых генов в экспериментальных образцах по сравнению с контрольными образцами.

Метод цифровой капельной полимеразной цепной реакции характеризуется исключительной чувствительностью и точностью даже при анализе единичных

молекул, в отсутствие необходимости использования стандартов (образцов ДНК с известной концентрацией) и калибровочных кривых при определении абсолютного количества молекул ДНК в пробе, и низкой чувствительностью к присутствию ингибиторов [10, 14].

В то же время актуальным остается вопрос о возможности оценки экспрессии генов холерного токсина при производстве вакцины. Современные молекулярно-генетические методы оценки экспрессии генов используются для диагностики инфекционных агентов, а их применение на этапах культивирования производственных штаммов-продуцентов ранее не рассматривалось.

Цель исследования — оценить уровень экспрессии гена *ctxA*, ответственного за синтез холерного токсина, с использованием методов обратной транскрипции с последующим проведением полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени и цифровой капельной полимеразной цепной реакции.

Материалы и методы

В работе использовали токсигенный штамм *V. cholerae* 569В серовара Инаба, полученный из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Культивирование проводили согласно нормативной документации (НД) в производственных условиях. Пробы бульонной культуры отбирали с 1 по 3 генерации при подготовке посевного материала и почасовые пробы (с 5 по 9 час) при культивировании в биореакторе.

Для получения стерильного супернатанта бульонной культуры и последующего определения его активности, взятую из реактора по окончании выращивания пробу в количестве 10 мл центрифугировали на центрифуге «Sigma» (10000 об/мин) в течение 15 мин и фильтровали через фильтрующие элементы с диаметром пор 0,22 мкм. В работе использовали фильтраты бульонной культуры штамма холерного вибриона *V. cholerae* 569В Инаба из 4 реакторов. Подготовку образцов проводили согласно СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», а также МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Контролировали характер роста на плотных и жидких питательных средах, концентрацию микробных клеток, специфическую активность протективных антигенов, наличие гена *ctxA*, морфологию клеток в пробах бульонной культуры с 1 по 3 генерации

при подготовке посевного материала и с 1 по 10 час при выращивании в биореакторе согласно НД.

Дот-иммуноанализ с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А и коллоидного золота (ДИА ЗНЧ). Дот-иммуноанализ проводили со специфической сывороткой (стандартный образец предприятия сыворотки антихолерогенной кроличьей, АХС) и последующей проявкой стафилококковым белком А, меченным наночастицами золота. Постановку анализа, учет и оценку результатов осуществляли, как указано ранее [3].

Для выделения и очистки РНК использовали набор «Total RNA Isolation System» («Promega»). Оценку чистоты выделенной РНК от белковых примесей проводили по значениям соотношения показаний спектрофотометра «Biowave DNA» («BiochromLtd», Великобритания) A260/A280, оценку чистоты от химических веществ компонентов рабочих растворов — по соотношению A260/A230. Синтез кДНК на матрице РНК методом обратной транскрипции (ОТ) выполняли с использованием набора «Реверта-L». В реакцию ОТ брали 950 нг РНК (в соответствии с инструкцией), на основе которой получали кДНК.

ОТ-ПЦР проводили с использованием специфических праймеров и зонда, рассчитанные Крицким А.А. с соавт. [6]. Амплификацию проводили на приборе Rotor-Gene Q («Qiagen») с детекцией по каналу Green. В качестве образца-калибратора нами были выбраны образцы, выделенные вначале выращивания, экспрессия которых была принята за единицу. Окончательная оценка уровня экспрессии генов осуществлялась методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$, учитывающим уровень экспрессии гена нормализатора *recA*, экспрессия которого в бактериальной клетке постоянна и не зависит от условий внешней среды (ген «домашнего хозяйства»). Обработку результатов осуществляли с использованием программного обеспечения к прибору Rotor-Gene Q.

Цифровую капельную ПЦР проводили с помощью системы для проведения монокапельной цифровой ПЦР QX200 («Bio-Rad»). Для технологии цкПЦР генерация капель и перенос эмульгированных образцов на ПЦР-планшеты выполнялись в соответствии с инструкциями производителя (Руководство по эксплуатации, Генератор капель QX200™ — Bio-Rad). Для проведения использовали праймеры и зонд, рассчитанные для ОТ-ПЦР. ПЦР-пробу, содержащую кДНК, смесь для проведения ПЦР (ddPCR Supermix) и масло, вносили в ячейки одноразового 8-канального картриджа для генерации микрокапель. В генераторе

капель образцы и масло смешивались, образуя эмульсию из приблизительно 20000 монодисперсных капель нанолитрового объема для каждого образца. Эмульсионные образцы переносили в 96-луночный планшет и проводили ПЦР-амплификацию. Режим амплификации был подобран в соответствии с рассчитанными праймерами и зондом. По завершении амплификации, планшет с образцами загружали в автоматизированное устройство для подсчета капель (ридер). Для проведения абсолютного количественного анализа ДНК-мишени вычисляли соотношение ПЦР-положительных и ПЦР-отрицательных капель в одном микролитре образца с помощью программного обеспечения QuantaSoft.

Результаты и обсуждение.

Нами была оценена экспрессия гена *ctxA* при глубинном культивировании производственного штамма *V. cholerae* 569В классического биовара методами ОТ-ПЦР и цкПЦР. Проанализированы пробы четырех производственных выращиваний штамма *V. cholerae* 569В, образцы отбирали с 1 до 10 часа выращивания. В ходе выращивания контролировали характер роста на плотных и жидких питательных средах, концентрацию микробных клеток, специфическую активность протективных антигенов, наличие гена *ctxA*, морфологию клеток в пробах культуры с 1 по 3 генерации при подготовке посевного материала и с 1 по 10 час при выращивании в биореакторе. Перечисленные показатели соответствовали НД.

Измерения концентрации микробных клеток свидетельствовали об увеличении прироста биомассы на шестом — седьмом часу выращивания, с максимумом на девятом. (рис. 1).

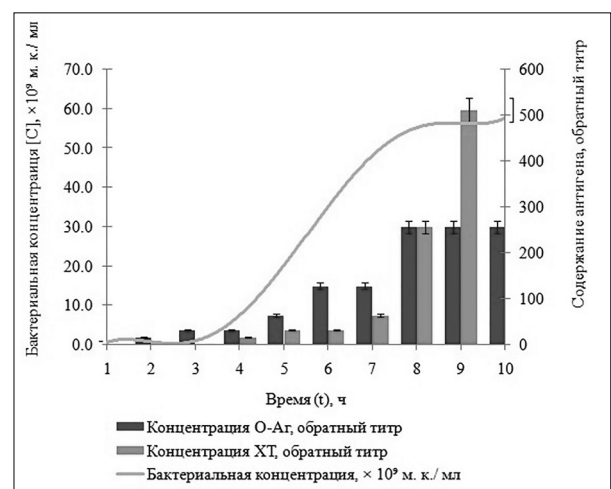


Рис. 1. Содержание протективных антигенов при глубинном культивировании *V. cholerae* 569В в почасовых пробах

Активность ХТ, так же, как и О-антигена, с первого часа культивирования холерного вибриона определяли методом ДИА ЗНЧ. Для этого были взяты почасовые пробы из реактора при глубинном культивировании штамма *V. cholerae* 569В, начиная с первого часа. В качестве сыворотки к ХТ использовали АХС. Наличие ХТ подтверждалось иммунохимическим методом ДИА ЗНЧ во всех образцах, начиная с третьего часа выращивания.

Согласно данным ДИА ЗНЧ, наличие активных компонентов детектировалось с первого часа выращивания для О-АГ [3] и с третьего часа — для ХТ. Максимальная продукция антигенов наблюдалась в стационарной фазе роста (9–10 часы от начала выращивания) со значением титра 1: 512 для холерного токсина.

Относительную количественную оценку экспрессии генов *V. cholerae* *ctxA* и *resA* проводили

методом ОТ-ПЦР. Экспрессию гена оценивали с последующей нормализацией по гену «домашнего хозяйства» (в нашем случае ген *recA*) и образцу сравнения (калибратору). В качестве образца-калибратора нами были выбраны образцы, выделенные в начале выращивания (I генерация при подготовке посевного материала), экспрессия которых была принята за единицу. Уровень экспрессии гена *ctxA* определяли во всех пробах. Данные, полученные методом ПЦР в режиме реального времени, показали, что увеличение уровня экспрессии данного гена происходило, как правило, на пятом и восьмом часу выращивания, с незначительным снижением с шестого по седьмой и на девятый час (табл. 1). Таким образом выявлено опережение экспрессии гена *ctxA* на 1–2 часа относительно прироста биомассы.

Таблица 1

Сравнение данных экспрессии гена *ctxA*, полученных методами ОТ-ПЦР и цифровой капельной ПЦР при глубинном культивировании производственного штамма *V. cholerae* 569В. Представлены средние значения четырех производственных выращиваний

Образец	Относительная концентрация, ОТ-ПЦР, среднее значение	Абсолютная концентрация, копий/мкл, цкПЦР, среднее значение	Концентрация бактерий, 10 ⁹ м.к./мл
I генерация	1 (калибратор)	3461	н.д.
II генерация	1,18	2806	1
III генерация	1,21	2207	3
5 час выращивания	1,5	4391	24,2
6 час выращивания	1,78	3191	35,2
7 час выращивания	1,66	3235	46,2
8 час выращивания	1,75	5729	55,0
9 час выращивания	1,65	6125	57,2

Далее образцы кДНК, исследованные методом ОТ-ПЦР, были анализированы методом цифровой капельной ПЦР. Для тестирования экспрессии гена *ctxA* использовали те же праймеры и зонд, однако режим амплификации был оптимизирован.

Как видно из таблицы 1, экспрессия гена *ctxA* также повышалась на 5 и 8 часах выращивания производственного цикла, снижаясь на 6–7 часах при росте бактериальной массы. Пример данных абсолютного количественного анализа методом цкПЦР одного из выращиваний, обработанные с помощью

программного обеспечения QuantaSoft, представлен на рисунке 2.

Итак, нами изучена возможность определения уровня экспрессии гена *ctxA*, ответственного за синтез холерного токсина, на этапе глубинного культивирования в ходе производственного цикла холерной вакцины. Результаты, полученные как методом ОТ-ПЦР, так и методом цифровой капельной ПЦР, свидетельствуют об опережении экспрессии гена *ctxA* на 1–2 часа по сравнению с приростом биомассы и регистрируемым выходом ХТ в культуральную жидкость методом ДИА ЗНЧ.

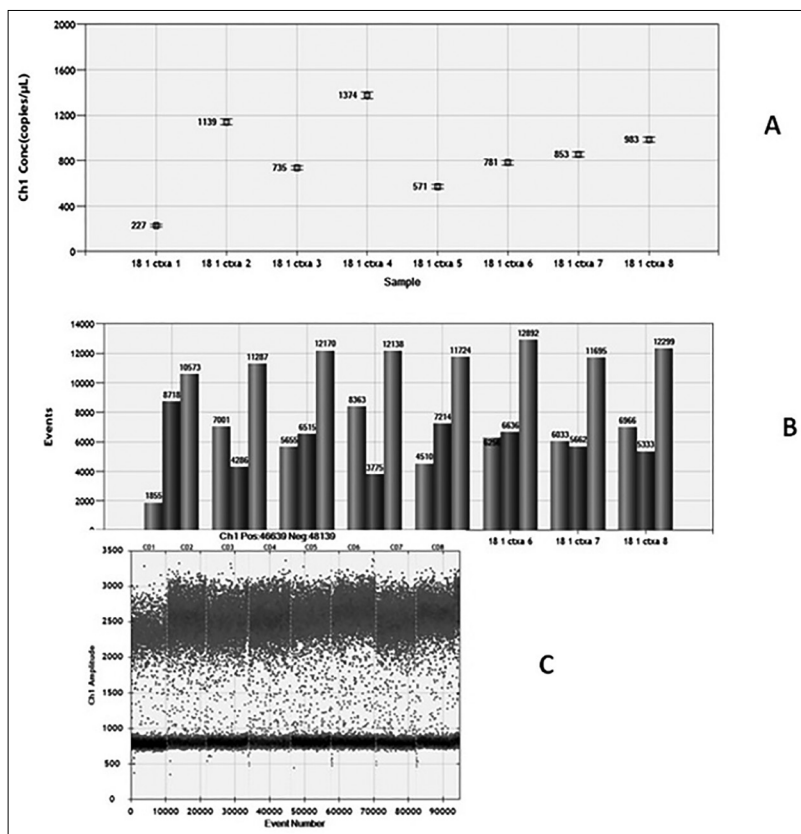


Рис. 2. Определение экспрессии гена *stxA* в почасовых пробах методом цкПЦР. А — концентрация положительных событий в микролитре; В — количество зарегистрированных капель в пробах (положительные, отрицательные, общее число капель); С — зависимость количества капель (число событий) от амплитуды флуоресценции

Заключение

По результатам данной работы была определена экспрессия гена *stxA* во временном промежутке с использованием молекулярно-генетических методов и сопоставлены показатели накопления биомассы и количественного содержания холерного токсина в культуральной среде. Определение уровня экспрессии генов, ответственных за синтез протективных антигенов, входящих в состав вакцин, на этапе культивирования производственных штаммов-продуцентов позволяет оценить экспрессию генов основных иммуногенов холерного вибриона, оптимизировать условия культивирования и, как следствие, увеличить выход необходимого антигенного компонента вакцины, а также дает возможность проводить контроль стабильности штаммов-продуцентов. Для оценки экспрессии генов метод цифровой капельной ПЦР является перспективным [4, 11], поскольку данный метод характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью, высокой точностью анализа, отсутствием необходимости использования гена-стандарта, а также низкой чувствительностью к действию ингибиторов реакции [4, 5, 8]. Указанные преимущества делают перспективной

возможность применения метода цкПЦР для оценки экспрессии генов, ответственных за синтез холерного токсина и О-антигенов, на этапе культивирования производственных штаммов-продуцентов.

Литература

1. Гаева А.В., Громова О.В., Дуракова О.С., Генералов С.В., Ливанова Л.Ф., Волох О.А. Определение специфической активности компонентов холерной химической вакцины с использованием культуры клеток // Биотехнология. — 2020. — Т. 36. — № 3. — С. 82 — 89.
2. Государственная Фармакопея Российской Федерации. ГФ РФ, XIV издание. — М., 2018.
3. Дуракова О.С., Громова О.В., Киреев М.Н., Воробьева С.А., Клокова О.Д., Ливанова Л.Ф., Белякова Н.И., Волох О.А. Применение дот-иммуноанализа для определения специфической активности антигенов в производстве холерной вакцины // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2018. — Т. 14. — № 4. — С. 10–13.
4. Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Агельдинов Р.А., Петрова Н.В., Фокин Ю.В., Хвостов Д.В. Анализ профиля экспрессии генов NOS 2, PDE5A HIF-1α методом циф-

- ровой капельной ПЦР // Биомедицина. — 2018. — № 3. — С. 4–16.
5. Киселева Я.Ю., Птицин К.Г., Радько С.П., Згода В.Г., Арчаков А.И. Цифровая капельная ПЦР — перспективный технологический подход к количественному профилированию микроРНК // Биомедицинская химия. — 2016. — Т. 62. — Вып. 4. — С. 403–410.
 6. Крицкий А.А., Челдышова Н.Б., Тучков И.В., Смирнова Н.И. Разработка алгоритма определения уровня экспрессии генов *ctxA* и *toxR* *Vibrio cholerae* методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени // Проблемы особо опасных инфекций. — 2017. — Т. 3. — С. 53–57.
 7. Москвитина Э.А., Янович Е.Г., Куриленко М.Л., Кругликов В.Д., Титова С.В., Левченко Д.А., Водопьянов А.С., Лопатин А.А., Иванова С.М., Мишанькин Б.М., Кривенко А.С., Анисимова Г.Б., Носков А.К. Холера: мониторинг эпидемиологической обстановки в мире и России (2010–2019 гг.). Прогноз на 2020 год // Проблемы особо опасных инфекций. — 2020. — № 2. — С. 38–47.
 8. Хьюгет Дж., Вейл А. Цифровая ПЦР как новая технология и ее потенциальный вклад в молекулярную диагностику // Клиническая лабораторная диагностика. — 2014. — № 11. — С. 6–8.
 9. Hayden R.T., Gu Z., Ingersoll J., Abdul-Ali D., Shi L., Pounds S., Caliendo A.M. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus // J. Clinical Microbiology. — 2013. — Vol. 51. — No. 2. — P. 540–546.
 10. Hindson Ch.M., Chevillet J.R., Briggs H.A., Gallichotte E.N., Ruf I.K., Hindson B.J., Vessella R.L., Tewari M. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR // Nat. Methods. — 2013. — Vol. 10. — No. 10. — P. 1003–1005.
 11. Lancikova V., Hricova A. Digital absolute gene expression analysis of essential starch-related genes in a radiation developed *Amaranthus cruentus* L. variety in comparison with real-time PCR // Plants. — 2020. — Vol. 9. — No. 8. — Art. 966. doi: 10.3390/plants9080966.
 12. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method // METHODS. — 2001. — Vol. 25. — P. 402–408.
 13. Marashi S.M.A., Rajabnia R., Fooladi A.A.I., Hojati Z., Moghim S., Esfahani B.N. Determination of *ctxAB* expression in *Vibrio cholerae* classical and El Tor strains using real-time PCR // Int. J. Mol. Cell. Med. — 2013. — Vol. 2. — No. 1. — P. 9–13.
 14. Taylor Sean C., Laperriere G., Germain H. Droplet digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data // Scientific Reports. — 2017. — Vol. 7. — No. 1. — Art. 2409. doi: 10.1038/s41598-017-02217-x.
- ## References
1. Gayeva AV, Gromova OV, Durakova OS, Generalov SV, Livanova LF, Volokh OA. Opredeleniye spetsificheskoy aktivnosti komponentov kholernoy khimicheskoy vaksiny s ispol'zovaniyem kul'tury kletok. Biotekhnologiya 2020; 36(3):82 – 89 (in Russian).
 2. Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. GF RF, XIV izdaniye. Moscow, 2018 (in Russian).
 3. Durakova OS, Gromova OV, Kireyev MN, Vorob'yeva SA, Klokoval OD, Livanova LF, Belyakova NI, Volokh OA. Primeneniye dot-immunoanaliza dlya opredeleniya spetsificheskoy aktivnosti antigenov v proizvodstve kholernoy vaksiny. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova 2018; 14(4):10–13 (in Russian).
 4. Karkishchenko VN, Dulya MS, Agel'dinov RA, Petrova NV, Fokin YuV, Khvostov DV. Analiz profilya ekspressii genov NOS 2, PDE5A HIF-1 α metodom tsifrovoy kapel'noy PTSR. Biomeditsina 2018; 3:4–16 (in Russian).
 5. Kiseleva YaYu, Ptitsin KG, Rad'ko SP, Zgoda VG, Archakov AI. Tsifrovaya kapel'naya PTSR — perspektivnyy tekhnologicheskyy podkhod k kolichestvennomu profilirovaniyu mikroRNK. Biomeditsinskaya khimiya 2016; 62(4):403–410 (in Russian).
 6. Kritskiy AA, Cheldyshova NB, Tuchkov IV, Smirnova NI. Razrabotka algoritma opredeleniya urovnya ekspressii genov *ctxA* i *toxR* *Vibrio cholerae* metodom OT-PTSR s gibridizatsionno-fluorescentnym uchetom rezul'tatov v rezhime real'nogo vremeni. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2017; 3:53–57 (in Russian).
 7. Moskvitina EA, Yanovich YeG, Kurilenko ML, Kругликов VD, Titova SV, Levchenko DA, Vodop'yanov AS, Lopatin AA, Ivanova SM, Mishan'kin BM, Krivenko AS, Anisimova GB, Noskov AK. Kholera: monitoring epidemiologicheskoy obstanovki v mire i Rossii (2010–2019 gg). Prognoz na 2020 god. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2020; 2:38–47 (in Russian).
 8. KH'yuget Dzh, Veyl A. Tsifrovaya PTSR kak novaya tekhnologiya i yeye potentsial'nyy vklad v molekulyarnuyu diagnostiku. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika 2014; 11:6–8 (in Russian).
 9. Hayden RT, Gu Z, Ingersoll J, Abdul-Ali D, Shi L, Pounds S, Caliendo AM. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. J Clinical Microbiology 2013; 51(2):540–546.
 10. Hindson ChM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, Vessella RL, Tewari M. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. Nat Methods 2013; 10(10):1003–1005.
 11. Lancikova V, Hricova A. Digital absolute gene expression analysis of essential starch-related genes in a radiation developed *Amaranthus cruentus* L. variety in comparison with

- real-time PCR. *Plants* 2020; 9(8):966. doi: 10.3390/plants9080966.
12. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *METHODS* 2001; 25:402–408.
13. Marashi SMA, Rajabnia R, Fooladi AAI, Hojati Z, Moghim S, Esfahani BN. Determination of *ctxAB* expression in *Vibrio cholerae* classical and El Tor strains using real-time PCR. *Int J Mol Cell Med* 2013; 2(1):9–13.
14. Taylor Sean C, Laperriere G, Germain H. Droplet digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. *Scientific Reports* 2017; 7(1):2409. doi: 10.1038/s41598-017-02217-x.

DETERMINATION OF THE LEVEL OF EXPRESSION OF THE *CTXA* GENE OF THE *VIBRIO CHOLERAE* 569B STRAIN IN THE PROCESS OF DEEP CULTIVATION BY RT-PCR METHODS WITH HYBRIDIZATION-FLUORESCENCE ACCOUNTING OF THE RESULTS IN REAL TIME AND DROPLET DIGITAL PCR

A.V. GAEVA¹, S.A. VOROBIEVA¹, O.S. DURAKOVA¹, O.V. GROMOVA¹,
A.A. KRITSKY², L.F. LIVANOVA¹, O.A. VOLOKH¹

¹ Russian Anti-Plague Institute «Microbe» of Rospotrebnadzor, Saratov;

² Biotechnological Campus, Moscow

In the production of a *Cholera* chemical vaccine, the control of the production of the main immunogens, their qualitative and quantitative characteristics, is also carried out at the stage of cultivation. Modern molecular genetic methods were used to determine the level of expression of the *ctxA* gene responsible for the synthesis of *Cholera* toxin (CT) in the broth culture of the production strain *Vibrio cholerae* 569B during submerged cultivation. The results obtained by both RT-PCR and droplet digital PCR indicate that the expression of the *ctxA* gene is 1–2 hours ahead of the increase in biomass and the recorded release of CT into the culture liquid. Determination of the expression level of the genes responsible for the synthesis of protective antigens that are part of vaccines at the stage of cultivation of production strains-producers will optimize the cultivation conditions and, as a result, increase the yield of the necessary antigenic component of the vaccine.

Keywords: cholera vaccine, gene expression, droplet digital PCR.

Address:

Gaeva A.V., Ph.D.
Researcher, laboratory of cholera vaccines,
Russian Anti-Plague Institute «Microbe» of Rospotrebnadzor
E-mail: rusrap@microbe.ru

Для цитирования:

Гаева А.В., Воробьева С.А., Дуракова О.С., Громова О.В., Крицкий А.А., Ливанова Л.Ф., Волох О.А. Определение уровня экспрессии гена *ctxA* штамма *Vibrio cholerae* 569B в процессе глубинного культивирования методами ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени и цифровой капельной ПЦР. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(1):25–31.

For citation:

Gaeva A.V., Vorobieva S.A., Durakova O.S., Gromova O.V., Kritsky A.A., Livanova L.F., Volokh O.A. Determination of the level of expression of the *ctxA* gene of the *Vibrio cholerae* 569b strain in the process of deep cultivation by RT-PCR methods with hybridization-fluorescence accounting of the results in real time and droplet digital PCR. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2023; 19(1):25–31 (in Russian).

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СОРТООБРАЗЦОВ КОРМОВЫХ КУЛЬТУР *DACTYLIS GLOMERATA* L., *AGROPYRON PECTINIFORME* ROEM. ET SCHULT И *PHLEUM PRATENSE* L., ОТОБРАННЫХ В УСЛОВИЯХ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

Б.Р. КУЛУЕВ^{1,2}, З.А. БЕРЕЖНЕВА^{1*}, К.П. ГАЙНУЛЛИНА¹, А.И. ГАБИТОВА², А.А. НИЗАЕВА³

¹ Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение ФГБНУ УФИЦ РАН,

² Башкирский государственный университет,

³ Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства — обособленное структурное подразделение ФГБНУ УФИЦ РАН, Уфа

Кормовые злаковые культуры занимают важное место в структуре сельскохозяйственных посевов во всех регионах России, так как полностью приспособлены к условиям континентального климата умеренных широт, отличаются высокой урожайностью, могут использоваться и как сенокосные, и как пастбищные. В Республике Башкортостан ведется селекция житняка ширококолосого (*Agropyron pectiniforme* Roem. et Schult), тимopheевки луговой (*Phleum pratense* L.), ежи сборной (*Dactylis glomerata* L.) и некоторых других. Несмотря на то, что в России создано множество сортов кормовых злаков, их генетическое разнообразие с использованием каких-либо методов молекулярной генетики остается неоцененным. Целью нашей работы была апробация ряда известных SSR-праймеров на сортообразцах житняка ширококолосого, тимopheевки луговой и ежи сборной, отобранных в условиях Южной лесостепной зоны Республики Башкортостан. Материалом для исследования послужили 6 линий и 1 сорт житняка ширококолосого, 9 линий тимopheевки луговой, 5 линий и 1 сорт ежи сборной. Молекулярно-генетический анализ образцов кормовых злаковых культур проводили методом полимеразной цепной реакции по 5 SSR-локусам для каждой культуры. В результате проведенных исследований для генетической паспортизации сортов и линий житняка ширококолосого наиболее эффективными оказались SSR-маркеры Xgwm205 и Xgwm249, для тимopheевки луговой — D01E04, A03A07, C02H01 и D01G10, для ежи сборной — FOG515 и FOG831.

Ключевые слова: житняк ширококолосый, тимopheевка луговая, ежа сборная, микросателлиты, SSR-анализ, генетический полиморфизм, генетическая паспортизация.

Введение

В структуре посевов кормовых культур в условиях Республики Башкортостан наибольшую долю занимают многолетние травы, технология возделывания которых характеризуется низкими энергозатратами. В условиях Южной лесостепной зоны Республики Башкортостан Башкирским институтом сельского хозяйства УФИЦ РАН (БНИИСХ УФИЦ РАН) ведется селекция таких кормовых злаковых культур, как житняк ширококолосый (*Agropyron pectiniforme* Roem. et Schult),

тимopheевка луговая (*Phleum pratense* L.), ежа сборная (*Dactylis glomerata* L.), кострец безостый (*Bromus inermis* Leyss.) и некоторых других. Все эти растения относятся к числу лучших кормовых культур, выращиваются во многих регионах России, по всей территории Республики Башкортостан, полностью приспособлены к условиям континентального климата умеренных широт, отличаются высокой урожайностью, могут использоваться и как сенокосные, и как пастбищные.

Селекция житняка ширококолосого в России ведется от южных регионов [7] до Республики Саха [4] с самыми суровыми климатическими условиями в мире. В нашей стране также широко проводятся работы по селекции тимopheевки луговой [9, 13], а из башкирских сортов можно отметить сорт Иглинская местная с допуском использования по всему Уральскому региону [1]. Селекция ежи сборной ведется во многих регионах России, к примеру, в Московской области в ФНЦ «ВИК имени В.Р. Вильямса [6], Приморском крае [12], Удмуртской

© 2023 г. Кулуев Б.Р., Бережнева З.А., Гайнуллина К.П., Габитова А.И., Низаева А.А.

* Автор для переписки:

Бережнева Зоя Александровна

м.н.с. лаборатории геномики растений Института биохимии и генетики — обособленного структурного подразделения ФГБНУ УФИЦ РАН

E-mail: berezhneva-z@yandex.ru

республике [8], Томской области [14], Республике Коми [5] и даже в Камчатском крае [10]. В Республике Башкортостан также проводятся работы по выведению новых сортов данной культуры и, к примеру, в 1998 году был зарегистрирован хорошо зарекомендовавший себя сорт Бирская 1 [1].

Несмотря на то, что в России создано множество сортов кормовых злаков, их генетическое разнообразие с использованием каких-либо методов молекулярной генетики остается неопределенным. Результаты такого анализа могут быть использованы для паспортизации линий и сортов этих ценных кормовых культур. Одним из часто используемых методов оценки генетического полиморфизма культурных растений является SSR-анализ [11]. В мире пока опубликовано не так много работ по SSR-анализу кормовых злаковых культур. Например, были проведены работы по SSR-анализу 9 подвидов ежи сборной с использованием 21 пары праймеров, что позволило разделить их на 3 группы и 5 кластеров, что совпало с их географическим происхождением [27]. SSR-анализ также использовался при изучении генома

житняка [21], причем для данной культуры могут подойти SSR-праймеры, подобранные для пшеницы мягкой [24]. Также были проведены работы по анализу микросателлитных локусов у тимофеевки луговой [16]. Авторами данного исследования были подобраны и испытаны 502 пары праймеров, с помощью которых удалось идентифицировать 355 SSR-маркеров.

Целью настоящей работы была апробация ряда описанных в литературе SSR-праймеров на сортообразцах житняка ширококолосого, тимофеевки луговой и ежи сборной, отобранных в условиях Южной лесостепной зоны Республики Башкортостан.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили 6 линий житняка ширококолосого (+1 сорт Чишминский 6), 9 линий тимофеевки луговой и 5 линий ежи сборной (+1 сорт Бирская 1) (табл. 1) которые проходят оценку в коллекционном питомнике БНИИСХ УФИЦ РАН в течение последних 5 лет.

Таблица 1

Линии и сорта житняка ширококолосого, тимофеевки луговой и ежи сборной, использованные для SSR-анализа

Лабораторный номер образца	Вид злаковой кормовой культуры	Обозначение линии или сорта
1	<i>Agropyron pectiniforme</i> (житняк ширококолосый)	29811
2		29812
3		51663
4		Чишминский 6
5		53547
6		36266
7		47346
11	<i>Phleum pratense</i> (timoфеевка луговая)	53748
12		52744
13		38157
14		52745
15		29813
16		52633
17		29702
18		29778
19		29779
21		<i>Dactylis glomerata</i> (ежа сборная)
22	53162	
23	45360	
24	47278	
25	28991	
26	51854	

Молекулярно-генетический анализ образцов кормовых злаковых культур проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) по 5 SSR-локусам для каждой культуры (табл. 2). По всем трем видам злаковых кормовых культур для работы были взяты микросателлитные маркеры, позволяющие выявлять

наибольшее количество полиморфных аллелей по данным [16, 24, 27]. Семена исследуемых растений проращивали в чашках Петри. ДНК выделяли из 10 дневных проростков с помощью набора «Genomic DNA Purification Kit» («Thermo Fisher Scientific», Литва). При выделении ДНК использовали 50–70 мг гомогенизированной смеси

проростков пяти растений каждого сортообразца для выявления возможного внутрисортного полиморфизма. ПЦР проводили в амплификаторе «Т-100» («Bio-Rad Laboratories», США). Конечный объем реакционной смеси составлял 20 мкл и содержал 1 мкл раствора тотальной геномной ДНК, 7,5 мкл раствора Dream Taq™ PCR Master Mix («Thermo Fisher Scientific», Литва), по 1 мкл каждого из пары праймеров («Евроген», Россия) и 7,5 мкл стерильной деионизированной воды. Амплификация проводилась по следующей программе: начальная денатурация при 94 °С – 4 мин.; 35 циклов: денатурация при 94 °С – 30 сек., отжиг праймеров при

$T_m \pm 2$ °С – 30 сек., элонгация при 72 °С – 1 мин.; конечная элонгация при 72 °С – 10 мин. Температуру отжига праймеров (T_m) определяли с помощью программы PrimerSelect (DNASar, США). ПЦР с каждым образцом по каждой паре праймеров проводили не менее 3 раз. Продукты амплификации разделяли методом вертикального электрофореза в камере VE-20 («Хеликон», Россия) в 10%-ном полиакриламидном геле в течение 4–6 часов при напряжении 400 В. Визуализацию и документирование результатов электрофореза осуществляли при помощи гель-документирующей системы Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad, США).

Таблица 2

SSR-маркеры, использованные для молекулярно-генетического анализа сортов и линий кормовых злаковых культур

Вид растения	SSR-маркер	Последовательность праймера от 5' к 3'	T_m , °С	Источник
<i>Agropyron pectiniforme</i> (житняк ширококолосый)	Xgwm205	F: 5'- CGACCCGGTTCACCTTCAG -3' R: 5'- AGTCGCCGTTGTATAGTGCC -3'	60	[24]
	Xgwm249	F: 5'- CAAATGGATCGAGAAAGGGA -3' R: 5'- CTGCCATTTTTCTGGATCTACC -3'	55	
	Xgwm271	F: 5'- CAAGATCGTGGAGCCAGC -3' R: 5'- AGCTGCTAGCTTTTTGGGACA -3'	60	
	Xgwm314	F: 5'- AGGAGCTCCTCTGTGCCAC -3' R: 5'- TTCGGGACTCTCTTCCCTG -3'	55	
	Xgwm544	F: 5'- TAGAATTCTTTATGGGGTCTGC -3' R: 5'- AGGATTCCAATCCTTCAAAATT -3'	55	
<i>Phleum pratense</i> (тимopheевка луговая)	A03A07	F: 5'- GTTGTTATTCGTGCCGAC -3' R: 5'- GCAATGGAGTATTCAAAAGC -3'	55	[16]
	A03E06	F: 5'- GTGCGGATCCAAGTAAGTAG -3' R: 5'- ATCTACCAACGAATAGGAAATG -3'	55	
	C02H01	F: 5'- CACTGGTGATCTTACACGC -3' R: 5'- AGATCATCCACGAATTGATC -3'	55	
	D01E04	F: 5'- TCTGTTGCCTATTCTGCTG -3' R: 5'- GCATTCACCTAAGACTGTGACA -3'	55	
	D01G10	F: 5'- ATAGATTGGGTGTTGGAGC -3' R: 5'- ATTCCATGTTAGCATGTCATC -3'	55	
<i>Dactylis glomerata</i> (ежа сборная)	FOG258	F: 5'- GCAGTATGGTGCTCTCTTT -3' R: 5'- CACTCGTTCAGATCGTCC -3'	50	[27]
	FOG362	F: 5'- ATTGCATGGTTCTGCACT -3' R: 5'- GTGAGTATGCGTGTGTTGCTA -3'	55	
	FOG514	F: 5'- CTGATTCGATATGAATGCTTC -3' R: 5'- ACATGATTGAGAAACGGAAC -3'	55	
	FOG515	F: 5'- GATGAAGGAACCTGCTGGAT -3' R: 5'- ACACCAGACCCTAAACAGC -3'	50	
	FOG831	F: 5'- TAAAGCATATGCAACAATGC -3' R: 5'- TGCTAAAGCCTTTTACAGCT -3'	50	

Результаты исследования

В результате анализа молекулярно-генетического полиморфизма кормовых злаковых культур методом SSR-ПЦР в условиях Республики Башкортостан нами были получены данные по аллельному составу

микросателлитных локусов Xgwm205, Xgwm249, Xgwm314 для 7 сортообразцов *Agropyron pectiniforme*; A03A07, A03E06, C02H01, D01E04, D01G109 для 9 линий *Phleum pratense*; FOG258, FOG362, FOG514, FOG515, FOG831 для 6 сортообразцов *Dactylis glomerata*.

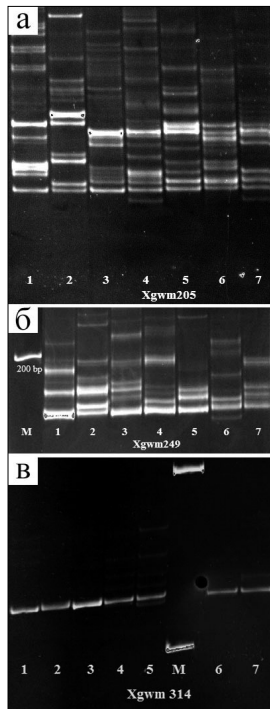


Рис. 1. Электрофоретические спектры, полученные при амплификации SSR-локусов *A. pectiniforme*: Xgwm205 (а), Xgwm249 (б), Xgwm314 (в). М – маркер молекулярной массы 100 бр (Евроген, Россия). 1 – линия 29811, 2 – линия 29812, 3 – линия 51663, 4 – сорт Чишминский 6, 5 – линия 53547, 6 – линия 36266, 7 – линия 47346

Так, микросателлитный анализ локуса Xgwm205 *A. pectiniforme* выявил множество ампликонов разного размера (рис. 1а), причем все анализируемые образцы отличались друг от друга по размерам и сочетанию различных бэндов. Это означает, что SSR-праймеры локуса Xgwm205 могут быть использованы для генетической паспортизации линий и сортов житняка ширококолосого. Анализ локуса Xgwm249 показал образование меньшего числа ампликонов, однако по их размерам и сочетанию полного совпадения между разными линиями житняка также не обнаруживалось. Это говорит о том, что данный микросателлитный locus также может быть использован для паспортизации сортов и линий *A. pectiniforme*. По результатам ПЦР-анализа локуса Xgwm314 получалось в основном по одному ампликону, причем вероятнее всего совпадающих по размеру у образцов 1–2 и 3–5 (рис. 1в). При этом лишь у линии 53547 амплифицировалось два продукта ПЦР. Ввиду получения при ПЦР данного локуса такого небольшого числа ампликонов, можно полагать, что данный SSR-маркер не эффективен для выявления ДНК-полиморфизма у житняка ширококолосого. По локусам Xgwm271 и Xgwm544 ПЦР не прошла, то есть ни одного ампликона не образовывалось, и поэтому

результаты по данным SSR-маркера на рисунке 1 не представлены.

Далее приступили к анализу ДНК образцов тимфеетки луговой. По локусу A03A07 было выявлено множество ампликонов разного размера. По сочетанию бэндов совпадения были обнаружены лишь между образцами 11 и 13. Между остальными линиями полного совпадения не выявлялось (рис. 2а).

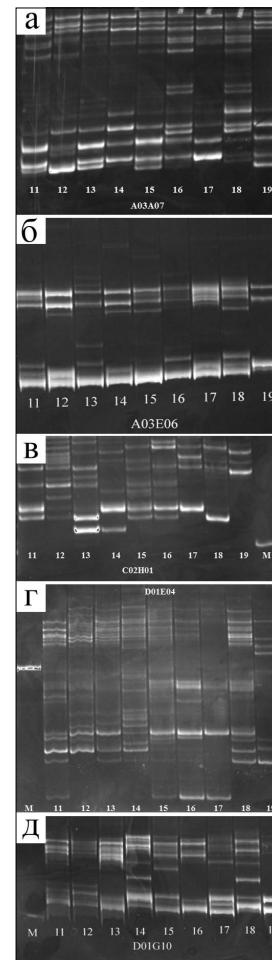


Рис. 2. Электрофоретические спектры, полученные при амплификации SSR-локусов *P. pratense*: A03A07 (а), A03E06 (б), C02H01 (в), D01E04 (г), D01G10 (д). М – маркер молекулярной массы 100 бр (Евроген, Россия). 11 – линия 53748, 12 – линия 52744, 13 – линия 38157, 14 – линия 52745, 15 – линия 29813, 16 – линия 52633, 17 – линия 29702, 18 – линия 29778, 19 – линия 29779

По локусу A03E06 число ампликонов было меньше и для образцов 12 и 14 были характерны идентичные электрофоретические спектры (рис. 2б). По локусу C02H01 были схожи образцы 15 и 16. Остальные линии отличались друг от друга по сочетанию ампликонов (рис. 2в). Locus D01E04 также оказался вполне информативным для идентификации сортообразцов (рис. 2г): линий,

полностью совпадающих по сочетанию ампликонов, в данном случае вовсе не выявилось. По результатам анализа микросателлитного локуса D01G10 также был обнаружен полиморфизм ДНК исследуемых линий тимOFFеевки луговой (рис. 2д). Полное совпадение размеров ампликонов было характерно только для образцов 11 и 12.

SSR-анализ *D. glomerata* по локусу FOG258 показал отсутствие совпадений ампликонов между разными линиями (рис. 3а). В то же время точный аллельный состав не представлялось возможным определить из-за большого числа ампликонов, сильно различающихся по размеру. Совпадений между разными линиями не было найдено и по SSR-маркеру FOG362 (рис. 3б), то есть праймеры к данному локусу также позволяли отличить друг от друга все исследуемые сортаобразцы ежи сборной.

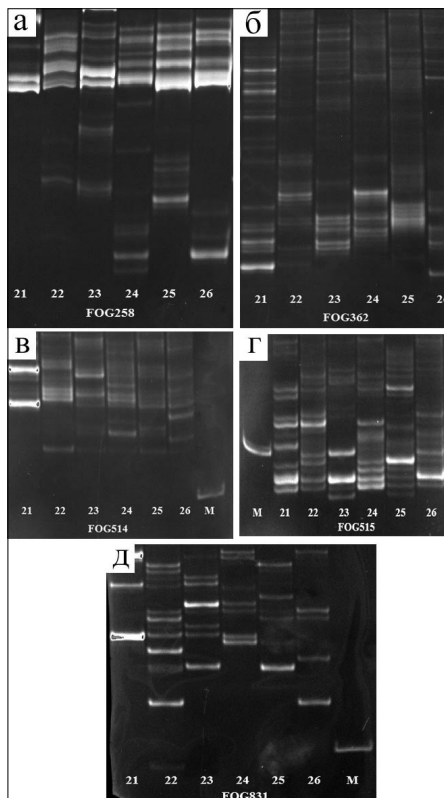


Рис. 3. Электрофоретические спектры, полученные при амплификации SSR-локусов *D. glomerata*: FOG258 (а), FOG362 (б), FOG514 (в), FOG515 (г), FOG831 (д). М – маркер молекулярной массы 100 бр (Евроген, Россия). 21 – сорт Бирская 1, 22 – линия 53162, 23 – линия 45360, 24 – линия 47278, 25 – линия 28991, 26 – линия 51854

Похожая ситуация наблюдалась при анализе локуса FOG514 (рис. 3в), однако число выявляемых ампликонов было меньше, чем в случае первых двух

SSR-маркеров. Тем не менее по данному локусу все сортаобразцы ежи сборной также различались между собой (рис. 3г), а электрофоретические спектры отличались наилучшей четкостью по сравнению с тремя предыдущими микросателлитными маркерами. Не было схожести между разными линиями ежи сборной и по результатам SSR-анализа с использованием праймеров к локусу FOG831 (рис. 3д). Основное отличие в этом случае заключалось в существенной разнице между размерами полученных ампликонов.

Обсуждение

Наиболее ценными SSR-маркерами для генетического анализа являются те, которые дают наибольший индекс полиморфизма PIC [3, 15]. Исходя из этого, нами для генетического анализа были использованы SSR-праймеры, дававшие, согласно данным литературы, наибольшее число полиморфных ампликонов. Многие авторы используют PIC для оценки полиморфизма микросателлитных маркеров [19, 23, 25], однако в нашем исследовании данный критерий применить не удалось, поскольку отличить гомозиготные и гетерозиготные фрагменты электрофоретических спектров не представлялось возможным ввиду полиплоидной природы исследуемых кормовых злаковых культур; следовательно, частоты аллелей SSR-локусов не могли быть рассчитаны. Практически все локусы характеризовались большим количеством аллелей, и среднее число аллелей на образец было более двух. Исходя из полученных нами данных, можно предполагать, что лучшими SSR-маркерами для житняка из использованных нами являются Xgwm205 и Xgwm249, так как именно они давали наибольшее число полиморфных ампликонов при ПЦР (см. рис. 1а, б). С другой стороны, нам не удалось добиться успешной амплификации локусов Xgwm271 и Xgwm544; возможно, это связано с тем, что все использованные нами праймеры были изначально подобраны к геному мягкой пшеницы [24], и, вероятно, они не подходят для SSR-анализа местных сортаобразцов житняка. Необходимо отметить, что большинство генетических исследований житняка связано с его использованием для переноса полезных генов в геном мягкой пшеницы. Например, SSR-анализ применялся для изучения гибридных линий мягкой пшеницы с житняком [18].

Имеется небольшое число работ, где проводился анализ генетического полиморфизма разных линий и сортов самого житняка. К примеру, в одной работе было идентифицировано 159 маркеров полиморфных повто-

ров простых последовательностей ДНК у *Agropyron cristatum* [29]. Для этого же вида житняка проводились также AFLP- и RAPD-анализы [28]. Несмотря на то, что в России на протяжении многих лет ведется изучение генетических ресурсов житняка [2], их SSR-анализ до наших исследований не применялся. В этой работе мы сообщаем о двух SSR-локусах, которые могут быть использованы для генетической паспортизации отечественных сортов житняка ширококолосого.

Из пяти проанализированных SSR-маркеров наиболее информативным для генетической паспортизации тимофеевки луговой оказался локус D01E04 (см. рис. 2г), так как он позволял разделить все изученные линии данной культуры. Достаточную эффективность показали также SSR-маркеры A03A07, C02H01, D01G10: по результатам их ПЦР-анализа совпадения обнаруживались лишь между двумя изучаемыми линиями (см. рис. 2а, б, д). Наихудшие результаты по уровню полиморфизма были выявлены для локуса A03E06 (см. рис. 2б). Можно полагать, что совместное использование всех этих пяти SSR-маркеров даст возможность осуществлять эффективную генетическую паспортизацию любых отечественных сортов *P. pratense*. В России до нашего исследования еще не проводили SSR-анализ тимофеевки луговой. Однако в мире, кроме работы [16], существует еще несколько подобных исследований. Например, был проведен микросателлитный анализ 88 образцов тимофеевки из стран Северной Европы и 8 образцов из Европы [26]. Тимофеевка оказалась очень полиморфной: с использованием 13 пар SSR-праймеров были амплифицированы в общей сложности 499 полиморфных аллелей, количество аллелей на локус варьировало от 15 до 74. Для генетического анализа *P. pratense* применялись также методы RAPD и UP-ПЦР [17].

В случае с ежой сборной наибольшее число четких и полиморфных электрофоретических спектров нами было получено при анализе локусов FOG515 и FOG831 (см. рис. 3г, д). Однако SSR-маркеры FOG258, FOG362 и FOG514 (см. рис. 3а, б, в) тоже представляют большой интерес, потому что при их анализе также все изученные сортообразцы ежи сборной отличались друг от друга.

Таким образом, при одновременном использовании всех этих пяти пар SSR-праймеров можно проводить эффективную генетическую паспортизацию сортов и линий ежи сборной. Помимо работы [27] о SSR-анализе ежи сборной, также сообщается в исследовании [22]. В другом исследовании при помощи SSR-анализа была установлена высокая генетическая изменчивость тетраплоидных *D. glomerata* в трех европейских популяциях и

обнаружены многочисленные редкие и локализованные аллели, которые были географически уникальными [20]. В России SSR-исследования *D. glomerata* пока еще не проводились; поэтому наша работа, как и в случае первых двух культур, была посвящена апробации известных SSR-праймеров на отечественных сортообразцах. В итоге были определены наиболее эффективные SSR-маркеры для генетической паспортизации ежи сборной.

Заключение

Для генетической паспортизации сортов и линий житняка ширококолосого наиболее эффективны SSR-маркеры Xgwm205 и Xgwm249, для тимофеевки луговой – D01E04, A03A07, C02H01 и D01G10, для ежи сборной – FOG515 и FOG831.

Работа выполнена в рамках государственного задания №122030200143-8 при поддержке гранта Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2021-549 от 31 мая 2022 г.).

Литература

1. Багманов Р.Т., Басырова А.З., Биктимиров Р.А., Гайнуллина К.П., Давлетов Ф.А., Зарипова В.М., Каримов И.К., Лещенко Н.И., Магафурова Ф.Ф., Марданишин И.С., Нигматзянов Р.А., Низаева А.А., Никонов В.И., Старцева Н.Ю., Фазлиахметов Х.Н., Хуснутдинов В.В., Чанышев И.О., Шакирзянов А.Х., Шафиков Р.А. Сорты сельскохозяйственных культур башкирского НИИСХ УФИЦ РАН // Каталог сортов. – Уфа. – 2019. – 104 с.
2. Бухтеева А.В., Малышев Л.Л., Дзюбенко Н.И., Кочегина А.А. Генетические ресурсы житняка *Agropyron Gaertn* / Всероссийский Институт генетических ресурсов растений имени В. И. Вавилова (ВИР). – Санкт-Петербург: ВИР, 2016. – 267 с.
3. Гайнуллина К.П., Кулуев Б.Р., Давлетов Ф.А. Оценка генетического разнообразия сортов и линий гороха с помощью SSR-анализа // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2020. – Т. 181. – № 3. – С. 70–80.
4. Корякина В.М., Кочегина А.А. Результаты изучения образцов рода житняк (*Agropyron Gaertn.*) из мировой коллекции генетических ресурсов растений ВИР в условиях Якутии // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2021. – Т. 182. – № 1. – С. 59–71.
5. Косолапова Т.В., Тулинов А.Г. Оценка параметров адаптивности ежи сборной в условиях Республики Коми //

- Российская сельскохозяйственная наука. — 2021. — № 5. — С. 22–26.
6. Костенко Н.Ю. Источники устойчивости ежи сборной к микозам // Защита и карантин растений. — 2021. — № 7. — С. 35–36.
 7. Кравцов В.В., Кравцов В.А. Житняк узкоколосый сорт Успех для засушливой зоны // Бюллетень Ставропольского научно-исследовательского института сельского хозяйства. — 2017. — № 9. — С. 163–166.
 8. Красноперова С.А., Веселкова Н.Р. К изучению адаптивного полиморфизма *Dactylis glomerata* L. в условиях Удмуртской Республики // Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науки о Земле. — 2011. — № 4. — С. 49–54.
 9. Максимов Р.А., Зезин Н.Н. Красноуфимский селекционный центр // Нива Урала. — 2011. — № 6–7. — С. 15–16.
 10. Стружкина Т.М. Селекционная ценность зарубежных образцов ежи сборной // Кормопроизводство. — 2009. — № 6. — С. 22–25.
 11. Сухарева А.С., Кулуев Б.Р. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений // Биомика. — 2018. — Т. 10. — № 1. — С. 69–84.
 12. Теличко О.Н., Галабурдина В.П. Исходный материал сортов ежи сборной для селекции // Аграрный вестник Приморья. — 2018. — № 2(10). — С. 15–17.
 13. Уразова Л.Д. Дикорастущая тимopheевка луговая — ценный исходный материал для селекции в условиях севера Западной Сибири // Научная жизнь. — 2014. — № 2. — С. 66–70.
 14. Уразова Л.Д., Ложкина О.В. Селекция ежи сборной в условиях таежной зоны Томской области // Научная жизнь. — 2012. — № 3. — С. 18–24.
 15. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // American Journal of Human Genetics. — 1980. — Vol. 32. — No. 3. — P. 314–331.
 16. Cai H.W., Yuyama N., Tamaki H., Yoshizawa A. Isolation and characterization of simple sequence repeat markers in the hexaploid forage grass timothy (*Phleum pratense* L.) // Theoretical and Applied Genetics. — 2003. — Vol. 107. — No. 8. — P. 1337–1349.
 17. Guo Y.D., Yli-Mattila T., Pulli S. Assessment of genetic variation in timothy (*Phleum pratense* L.) using RAPD and UP-PCR // Hereditas. — 2003. — Vol. 138. — No. 2. — P. 101–113.
 18. Han H., Bai L., Su J., Zhang J., Song L., Gao A., Yang X., Li X., Liu W., Li L. Genetic rearrangements of six wheat-*Agropyron cristatum* 6P addition lines revealed by molecular markers // PLoS One. — 2014. — Vol. 9. — No. 3. — e91066. doi: 10.1371/journal.pone.0091066.
 19. Jones E.S., Dupal M.P., Kolliker R., Drayton M.C., Forster J.W. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) // Theoretical and Applied Genetics. — 2001. — Vol. 102. — P. 405–415.
 20. Last L., Widmer F., Fjellstad W., Stoyanova S., Kolliker R. Genetic diversity of natural orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) populations in three regions in Europe // BMC Genetics. — 2013. — Vol. 14. — Art. 102. doi: 10.1186/1471-2156-14-102.
 21. Li N., Wang X.P., Cao S.H., Zhang X.Q. Genome constitution of *Agropyron elongatum* 4x by biochemical and SSR markers // Yi Chuan Xue Bao. — 2005. — Vol. 32. — No. 6. — P. 571–578 (in Chinese).
 22. Litrico I., Bech N., Flajoulot S., Cadier D., Talon C., Gibelin C., Barre P. Cross-species amplification tests and diversity analysis using 56 PCR markers in *Dactylis glomerata* and *Lolium perenne* // Molecular Ecology Resources. — 2009. — Vol. 9. — No. 1. — P. 159–164.
 23. Ott J. Analysis of human genetic linkage / Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1985. — P. 862–864.
 24. Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat // Genetics. — 1998. — Vol. 149. — No. 4. — P. 2007–2023.
 25. Saal B., Wricke G. Development of simple sequence repeats in rye (*Secale cereale* L.) // Genome. — 1999. — Vol. 42. — P. 964–972.
 26. Tanhuanpää P., Manninen O. High SSR diversity but little differentiation between accessions of Nordic timothy (*Phleum pratense* L.) // Hereditas. — 2012. — Vol. 149. — No. 4. — P. 114–127.
 27. Yan D., Zhao X., Cheng Y., Ma X., Huang L., Zhang X. Phylogenetic and diversity analysis of *Dactylis glomerata* subspecies using SSR and IT-ISJ markers // Molecules. — 2016. — Vol. 21. — No. 11. — Art. 1459. doi: 10.3390/molecules21111459.
 28. Yu X., Li X., Ma Y., Yu Z., Li Z. A genetic linkage map of crested wheatgrass based on AFLP and RAPD markers // Genome. — 2012. — Vol. 55. — No. 4. — P. 327–335.
 29. Zwyrtková J., Blavet N., Doležalová A., Cápál P., Said M., Molnár I., Vrána J., Doležel J., Hřibová E. Draft sequencing crested wheatgrass chromosomes identified evolutionary structural changes and genes and facilitated the development of SSR Markers // International Journal of Molecular Sciences. — 2022. — Vol. 23. — No. 6. — Art. 3191. doi: 10.3390/ijms23063191.

References

1. Bagmanov RT, Basyrova AZ, Biktimirov RA, Gainullina KP, Davletov FA, Zaripova VM, Karimov IK, Leshchenko NI, Magafurova F F, Mardanshin IS, Nigmatzyanov RA, Nizaeva AA, Nikonov VI, Startseva NYu, Fazliakhmetov HN, Khusnutdinov VV, Chanyshiev IO, Shakirzyanov AKh, Shafikov RA. Sorta sel'skokhozyaystvennykh kul'tur

- bashkirskogo NIISKH UFITS RAN. Katalog sortov. Ufa 2019: 104 (in Russian).
2. Bukhteyeva AV, Malyshev LL, Dzyubenko NI, Kochegina AA. Geneticheskiye resursy zhitnyaka *Agropyron* Gaertn. Vserossiyskiy Institut geneticheskikh resursov rasteniy imeni V. I. Vavilova (VIR). St-Petersburg: VIR, 2016: 267 (in Russian).
 3. Gaynullina KP, Kuluyev BR, Davletov FA. Otsenka geneticheskogo raznoobraziya sortov i liniy gorokha s pomoshch'yu SSR-analiza. Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii 2020; 181(3):70–80 (in Russian).
 4. Koryakina VM, Kochegina AA. Rezul'taty izucheniya obraztsov roda zhitnyak (*Agropyron* Gaertn.) iz mirovoy kolleksii geneticheskikh resursov rasteniy VIR v usloviyakh Yakutii. Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii 2021; 182(1):59–71 (in Russian).
 5. Kosolapova TV, Tulinov AG. Otsenka parametrov adaptivnosti yezhi sbornoy v usloviyakh Respubliki Komi. Rossiyskaya sel'skokhozyaystvennaya nauka 2021; 5:22–26 (in Russian).
 6. Kostenko NYu. Istochniki ustoychivosti yezhi sbornoy k mikozam. Zashchita i karantin rasteniy 2021; 7:35–36 (in Russian).
 7. Kravtsov VV, Kravtsov VA. Zhitnyak uzkokolosyy sort Uspekhi dlya zasushlivoy zony. Byulleten' Stavropol'skogo nauchno-issledovatel'skogo instituta sel'skogo khozyaystva 2017; 9:163–166 (in Russian).
 8. Krasnoperova SA, Veselkova NR. K izucheniyu adaptivnogo polimorfizma *Dactylis glomerata* L. v usloviyakh Udmurtskoy Respubliki. Vestnik Udmurtskogo universiteta. Seriya Biologiya. Nauki o Zemle 2011; 4:49–54 (in Russian).
 9. Maksimov R.A., Zezin N.N. Krasnoufimskiy selektsionnyy tsentr. Niva Urala 2011; 6–7:15–16 (in Russian) (in Russian).
 10. Struzhkina TM. Seleksionnaya tsennost' zarubezhnykh obraztsov yezhi sbornoy. Kormoproizvodstvo 2009; 6:22–25 (in Russian).
 11. Sukhareva AS, Kuluyev BR. DNK-markery dlya geneticheskogo analiza sortov kul'turnykh rasteniy. Biomika 2018; 10(1):69–84 (in Russian).
 12. Telichko ON, Galaburdina VP. Iskhodnyy material sortov yezhi sbornoy dlya selektsii. Agrarnyy vestnik Primor'ya 2018; 2(10):15–17 (in Russian).
 13. Urazova LD. Dikorastushchaya timofeyevka lugovaya – tsennyy iskhodnyy material dlya selektsii v usloviyakh severa Zapadnoy Sibiri. Nauchnaya zhizn' 2014; 2:66–70 (in Russian).
 14. Urazova LD, Lozhkina OV. Seleksiya yezhi sbornoy v usloviyakh tayezhnoy zony Tomskoy oblasti. Nauchnaya zhizn' 2012; 3:18–24 (in Russian).
 15. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics 1980; 32(3):314–331.
 16. Cai HW, Yuyama N, Tamaki H, Yoshizawa A. Isolation and characterization of simple sequence repeat markers in the hexaploid forage grass timothy (*Phleum pratense* L.). Theoretical and Applied Genetics 2003; 107(8):1337–1349.
 17. Guo YD, Yli-Mattila T, Pulli S. Assessment of genetic variation in timothy (*Phleum pratense* L.) using RAPD and UP-PCR. Hereditas 2003; 138(2):101–113.
 18. Han H, Bai L, Su J, Zhang J, Song L, Gao A, Yang X, Li X, Liu W, Li L. Genetic rearrangements of six wheat-*Agropyron cristatum* 6P addition lines revealed by molecular markers. PLoS One 2014; 9(3):e91066. doi: 10.1371/journal.pone.0091066.
 19. Jones ES, Dupal MP, Kolliker R, Drayton MC, Forster JW. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Theoretical and Applied Genetics 2001; 102:405–415.
 20. Last L, Widmer F, Fjellstad W, Stoyanova S, Kolliker R. Genetic diversity of natural orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) populations in three regions in Europe. BMC Genetics 2013; 14:102. doi: 10.1186/1471-2156-14-102.
 21. Li N, Wang XP, Cao SH, Zhang XQ. Genome constitution of *Agropyron elongatum* 4x by biochemical and SSR markers. Yi Chuan Xue Bao 2005; 32(6):571–578 (in Chinese).
 22. Litrico I, Bech N, Flajoulot S, Cadier D, Talon C, Gibelin C, Barre P. Cross-species amplification tests and diversity analysis using 56 PCR markers in *Dactylis glomerata* and *Lolium perenne*. Molecular Ecology Resources 2009; 9(1):159–164.
 23. Ott J. Analysis of human genetic linkage. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1985:862–864.
 24. Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganai MW. A microsatellite map of wheat. Genetics 1998; 149(4):2007–2023.
 25. Saal B, Wricke G. Development of simple sequence repeats in rye (*Secale cereale* L.). Genome 1999; 42:964–972.
 26. Tanhuanpää P, Manninen O. High SSR diversity but little differentiation between accessions of Nordic timothy (*Phleum pratense* L.). Hereditas 2012; 149(4):114–127.
 27. Yan D, Zhao X, Cheng Y, Ma X, Huang L, Zhang X. Phylogenetic and diversity analysis of *Dactylis glomerata* subspecies using SSR and IT-ISJ markers. Molecules 2016; 21(11):1459. doi: 10.3390/molecules21111459.
 28. Yu X, Li X, Ma Y, Yu Z, Li Z. A genetic linkage map of crested wheatgrass based on AFLP and RAPD markers. Genome 2012; 55(4):327–335.
 29. Zwyrtková J, Blavet N, Doležalová A, Cápál P, Said M, Molnár I, Vrána J, Doležel J, Hříbová E. Draft sequencing crested wheatgrass chromosomes identified evolutionary structural changes and genes and facilitated the development of SSR Markers. International Journal of Molecular Sciences 2022; 23(6):3191. doi: 10.3390/ijms23063191.

ASSESSMENT OF THE GENETIC DIVERSITY OF BREEDING LINES OF FORAGE CROPS *DACTYLIS GLOMERATA* L., *AGROPYRON PECTINIFORME* ROEM. ET SCHULT AND *PHLEUM PRATENSE* L., SELECTED IN THE CONDITIONS OF THE REPUBLIC OF BASHKORTOSTAN

B.R. KULUEV^{1,2}, Z.A. BEREZHNEVA¹, K.P. GAINULLINA¹, A.I. GABITOVA², A.A. NIZAEVA³

¹ *Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,*

² *Bashkir State University,*

³ *Bashkir Research Institute of Agriculture – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa*

Forage cereals occupy an important place in the structure of agricultural crops in all regions of Russia, as they are fully adapted to the conditions of the continental climate of temperate latitudes, have high yields, and can be used both as haymaking and pasture. In the Republic of Bashkortostan is the breeding of *Agropyron pectiniforme* Roem. et Schult, *Phleum pratense* L., *Dactylis glomerata* L. and some others. Despite the fact that many varieties of fodder cereals have been created in Russia, their genetic diversity using any methods of molecular genetics remains unappreciated. The purpose of our work was to test a number of well-known SSR primers on cultivars of the *A. pectiniforme*, *P. pratense* and *D. glomerata*, selected in the conditions of the Southern forest-steppe zone of the Republic of Bashkortostan. The material for the study was 6 lines and 1 variety of *A. pectiniforme*, 9 lines of *P. pratense*, 5 lines and 1 variety of *D. glomerata*. Molecular genetic analysis of samples of fodder cereal crops was carried out by polymerase chain reaction with 5 SSR loci for each crop. As a result of the conducted studies, SSR markers Xgwm205 and Xgwm249 turned out to be the most effective for genetic certification of varieties and lines of *A. pectiniforme*, D01E04, A03A07, C02H01 and D01G10 for *P. pratense*, FOG515 and FOG831 for *D. glomerata*.

Keywords: *Dactylis glomerata*, *Phleum pratense*, *Agropyron pectiniforme*, microsatellites, SSR analysis, genetic polymorphism, genetic certification.

Address:

Berezhneva Z.A.

junior researcher in the laboratory of plant genomics, Institute of biochemistry and genetics – a separate structural subdivision of the Ural Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences

E-mail: berezhneva-z@yandex.ru

Для цитирования:

Кулуев Б.Р., Бережнева З.А., Гайнуллина К.П., Габитова А.И., Низаева А.А. Оценка генетического разнообразия сортообразцов кормовых культур *Dactylis glomerata* L., *Agropyron pectiniforme* Roem. et Schult и *Phleum pratense* L., отобранных в условиях Республики Башкортостан. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(1):32–40.

For citation:

Kuluev B.R., Berezhneva Z.A., Gainullina K.P., Gabitova A.I., Nizaeva A.A. Assessment of the genetic diversity of breeding lines of forage crops *Dactylis glomerata* L., *Agropyron pectiniforme* Roem. et Schult and *Phleum pratense* L., selected in the conditions of the Republic of Bashkortostan. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(1):32–40 (in Russian).

АНАЛИЗ ТЕНДЕНЦИЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА ОТЕЧЕСТВЕННОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА АНТИРАБИЧЕСКОГО ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЛОШАДИ ЖИДКОГО КАК ЭЛЕМЕНТА СИСТЕМЫ МЕНЕДЖМЕНТА КАЧЕСТВА НА ПРЕДПРИЯТИИ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

А.А. САВЕНКОВА^{1*}, О.А. ЛОБОВИКОВА¹, Е.Г. АБРАМОВА^{1,2}, И.В. ШУЛЬГИНА¹,
С.В. ГЕНЕРАЛОВ¹, А.С. ФЕСЬКОВА¹, С.С. ГАЛЕТОВА¹, А.К. НИКИФОРОВ^{1,2}

¹ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора,

²Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова,
Саратов

Российскую Федерацию относят к странам со средним уровнем риска заражения человека бешенством. При проведении постэкспозиционного лечения для предупреждения заболевания людей бешенством в комплексе с вакциной антирабической используют антирабический иммуноглобулин. В нашей стране единственным производителем антирабического иммуноглобулина является Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Статистический анализ многолетних показателей качества иммунобиологического лекарственного препарата «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий» с использованием контрольных карт Шухарта, а также анализ корреляционных связей между данными показателей выпускающего контроля качества предприятия и испытательной лаборатории подтвердили стабильность производства продукции, соответствующей требованиям нормативной документации по всем показателям спецификации.

Ключевые слова: иммуноглобулин антирабический, показатели качества, контрольные карты Шухарта, коэффициент корреляции.

Введение

Бешенство — вакциноконтролируемое зоонозное вирусное заболевание, которое встречается в более чем в 150 странах и территориях, при этом ежегодно от бешенства в мире умирает около 60 тысяч человек. Передача вируса бешенства людям в большинстве случаев происходит от домашних собак, в последние годы отмечается рост числа укусов дикими животными. Инфекция передается людям и животным через укусы или царапины, обычно посредством слюны [1, 12].

ВОЗ относит Российскую Федерацию к группе стран со средним уровнем риска заражения человека бешенством. В нашей стране на протяжении нескольких десятилетий остается напряженной ситуация по бешен-

ству среди животных, сохраняется тенденция к росту числа регионов, неблагополучных по данному заболеванию. Вовлечение в эпизоотический процесс домашних и сельскохозяйственных животных обусловлено сохранением активности природных очагов, что в совокупности повышает риск инфицирования людей.

Ежегодно в Российской Федерации по поводу укусов животными обращается около 400 тысяч человек, из них более 250 тысяч нуждаются в проведении постэкспозиционного лечения. Абсолютная летальность бешенства при развитии клинических симптомов заболевания придает исключительную важность проблеме своевременного оказания антирабической помощи [1, 4].

Лечебно-профилактической иммунизации антирабической вакциной подлежат все лица, подвергшиеся риску заражения бешенством. При любых повреждениях кожных покровов и при попадании слюны на слизистые оболочки или поврежденную кожу, обусловленном больными или подозрительными на бешенство животными, дополнительно применяют антирабический иммуноглобулин (АИГ).

Во всем государстве единственным производителем антирабического иммуноглобулина является Российский научно-исследовательский противочумный институт

© 2023 г. Савенкова А.А., Лобовикова О.А., Абрамова Е.Г., Шутьгина И.В., Генералов С.В., Феськова А.С., Галетова С.С., Никифоров А.К.

* **Автор для переписки:**

Савенкова Анастасия Александровна,
младший научный сотрудник отдела стандартизации, качества и метрологии ФКУН Российский противочумный институт «Микроб»
Роспотребнадзора

E-mail: savencova.vita@gmail.com

«Микроб». Производство АИГ было организовано в конце 1990-х годов, к настоящему времени выпущено 189 коммерческих серий иммунобиологического лекарственного препарата (ИЛП) «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий» (регистрационное удостоверение РУ Р N 002639/01), входящего в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения.

В производство антирабического иммуноглобулина активно внедряется стратегия GMP (Good Manufacturing Practice, Надлежащая производственная практика), гарантирующая соответствие лекарственного препарата своему назначению, требованиям регистрационного досье и обеспечивающая минимизацию рисков для пациентов, связанных с безопасностью и эффективностью применения [5]. Безопасность и эффективность лекарственного препарата, в свою очередь, определяются его качеством, которое требует всестороннего описания и непрерывного контроля как со стороны производителя, так и регуляторного органа, а также постоянного совершенствования в соответствии с научно-техническим прогрессом [3]. Одним из основных элементов надлежащей практики производства лекарственного препарата является контроль качества готовой лекарственной формы, требования к которой изложены в спецификации нормативной документации.

Целью настоящей работы явился анализ показателей качества коммерческих серий ИЛП «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий», произведенных и допущенных к обращению в период с 2016 по 2021 гг.

Материалы и методы

Объект исследования — ИЛП «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий» производства Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора, коммерческих серий №№ 151-182, произведенных в период 2016—2021 гг.

Анализ тенденций качества проводили по результатам испытаний антирабического иммуноглобулина при выпускающем контроле качества в организации-изготовителе и при подтверждении соответствия в испытательных лабораториях (ИЛ), по показателям, включенным в спецификацию фармакопейной статьи предприятия ФСП Р N 002639/01.

При анализе количественных показателей качества были использованы карты индивидуальных значений Шухарта (X-карта). Оценку стабильности показателей

качества проводили в соответствии с ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015 [7].

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием Microsoft Excel 2010.

Анализ корреляционных связей между данными показателями выпускающего контроля предприятия и испытаниями ИЛ проводили, рассчитывая коэффициент корреляции Пирсона [11]. Для оценки значимости корреляции применяли шкалу Чеддока: слабая — от 0,1 до 0,3; умеренная — от 0,3 до 0,5; заметная — от 0,5 до 0,7; высокая — от 0,7 до 0,9; весьма высокая (сильная) — от 0,9 до 1,0 [9].

Результаты и обсуждение

Производство и контроль качества иммунобиологических лекарственных препаратов характеризуются особой вариабельностью по причине использования биологических процессов и систем, что диктует необходимость постоянного мониторинга стабильности производственного процесса и показателей качества для исключения возможности производства недоброкачественной продукции. В соответствии с «Правилами надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза» производитель обязан регулярно проводить анализ тенденций качества при производстве лекарственных препаратов с документальным оформлением результатов в виде обзоров качества продукции [5]. Обзор качества служит универсальным инструментом, позволяющим делать выводы об эффективности действующего производственного процесса и принимать управленческие решения о необходимости проведения корректирующих и предупреждающих действий, внесения изменений в рамках фармацевтической системы качества и возможных улучшений [6].

Одним из основных разделов обзора качества является оценка результатов контроля готовой продукции. При подготовке ежегодных обзоров качества в период с 2016 по 2021 годы были проанализированы показатели качества 32 производственных серий №№ 151-182 ИЛП «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий» по данным сводных протоколов производства. Дополнительно были рассмотрены результаты контроля вышеозначенных серий продукции в ИЛ, проводимого в рамках подтверждения соответствия требованиям нормативной документации перед вводом в гражданский оборот.

ФСП Р N 002639/01, действующая на момент выпуска антирабического иммуноглобулина вышеука-

занных серий, предусматривает выпускающий контроль качества АИГ по следующим показателям: описание; подлинность (видоспецифичность, специфичность антигенов); прозрачность; цветность; механические включения; рН; герметизация; содержание белка; тесты на чистоту — электрофоретическая однородность, содержание риванола и спирта этилового; стерильность; пирогенность; токсичность; специфическая активность. Кроме того, ФСП предусмотрены тесты контроля иммуноглобулина, разведенного 1:100, выпускаемого в комплекте с препаратом: описание, рН, прозрачность, цветность, белок, стерильность, а также регламентированы требования к упаковке и маркировке препарата.

Результаты испытаний вышеуказанных серий АИГ как производителем, так в ИЛ, свидетельствовали о соответствии выпускаемой продукции требованиям нормативной документации по всем показателям спецификации.

Количественные показатели (прозрачность, цветность, рН, белок, спирт этиловый, специфическая активность — для иммуноглобулина антирабического; рН, белок, прозрачность, цветность — для иммуноглобулина антирабического разведенного 1:100, применяемого для оценки чувствительности к гетерологичному белку, были проанализированы с использованием методов медицинской статистики (табл. 1) [8, 10].

Таблица 1

Результаты оценки качества ИАП «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий»

№ п/п	Показатель качества	Требование ФСП	Результаты					
			производителя			ИЛ		
			min	max	±m	min	max	±m
1.	Прозрачность	Не более 0,05	0,002	0,017	0,010±0,0013	0,003	0,02	0,0124±0,0017
2.	Цветность	Не более 0,15	0,009	0,038	0,0270±0,0025	0,02	0,05	0,0316±0,0033
3.	рН	От 6,6 до 7,4	6,7	7,2	6,9444±0,0364	6,63	7,2	6,9772±0,0522
4.	Белок	От 9 до 11%	9,1	9,8	9,3668±0,0693	9,2	9,7	9,4252±0,0583
5.	Спирт этиловый	Не более 4,5 %	0,05	3,3	0,6903±0,2855	0,005	3,3	0,7126±0,3181
6.	Специфическая активность	Не менее 150 МЕ/мл	150	276	180±10,05	153	205	176±5,04
Реагенты, выпускаемые в комплекте с препаратом: иммуноглобулин разведенный 1:100								
7.	рН	От 6,6 до 7,4	6,71	7,4	7,1016±0,0839	6,7	7,3	7,0348±0,0760
8.	Прозрачность	Не более 0,05	0,001	0,003	0,0015±0,0002	0,001	0,019	0,0024±0,0015
9.	Цветность	Не более 0,15	0,001	0,004	0,0023±0,0003	0,001	0,03	0,0031±0,0023
10.	Белок	От 0,015 до 0,115%	0,039	0,115	0,0903±0,0075	0,051	0,108	0,0863±0,0061

Физико-химические свойства препарата оценивают, прежде всего, в двух колориметрических тестах: прозрачности и цветности.

Измерение прозрачности проводят при 540 нм — максимум поглощения для мутных растворов. При максимально допустимом значении 0,05 ед. оптической плотности прозрачность всех выпущенных серий антирабического иммуноглобулина находилась в пределах 0,002–0,017 ед. оптической плотности, что свидетельствует о стабильности молекулярных параметров препарата, отсутствии агрегации иммуноглобулина. Постоянство этого показателя было достигнуто благодаря внедрению в серийное производство разработанной в нашем учреждении уникальной технологии каскадной фильтрации [2], позволяющей получать высокоочищенный целевой продукт, а также стабилизации раствора иммуноглобулина глицином. Кроме того, для производства антирабического иммуноглобулина используется высококачественная первичная упаковка, исключающая процесс деляминации.

Дополнительные возможности для статистической оценки количественных показателей качества предоставляют контрольные карты Шухарта, позволяющие графически представить и сопоставить информацию по выборкам. В соответствии с теорией Шухарта, предложенной в 1924 году [7], для любого производственного процесса характерно два вида изменчивости. Первый вид изменчивости обусловлен «случайными причинами», присутствующими постоянно, совокупность которых определяет присущую процессу внутреннюю изменчивость. Исключение или уменьшение влияния обычных причин возможно только после фундаментального изменения процесса, требует управленческих решений и выделения значительных ресурсов. Второй вид изменчивости процесса представляет собой реальные перемены в процессе из-за «неслучайных» или «особых» причин, таких как недостаточная однородность материала, неисправность технологического или контрольного оборудования, квалификация персонала, невыполнение процедур и т.д. Цель использования контрольных карт заключается в том,

чтобы на фоне собственной изменчивости обнаружить изменчивость, вызываемую особыми причинами. Для обнаружения изменчивости второго рода рассчитывают допустимые границы собственной изменчивости, нарушение которых и является свидетельством действия особых причин и выхода процесса из управляемого состояния.

При анализе показателя «Прозрачность» с применением контрольных карт индивидуальных значений (рис.1) было установлено, что процесс находится в состоянии статистической управляемости в отношении внутренней изменчивости, наблюдается рассеяние значений показателя в пределах границ нормативных требований и тренд незначительного смещения значений X в сторону снижения. Таким образом, статистически была подтверждена тенденция сохранения значений показателя «прозрачность» на стабильно низком уровне.



Рис.1. X-карта индивидуальных значений для показателя «Прозрачность»

Следующий важный показатель: «Цветность» определяют при 400 нм — максимуме поглощения для гемоглобина. Показатели АИГ выпущенных серий составили 0,009–0,04 при норме 0,15 ед. оптической плотности. Следует отметить, что средние значения этого показателя — $0,0270 \pm 0,0025$, по данным производителя, и $0,0316 \pm 0,0033$, по данным ИЛ, были более чем в 5 раз ниже установленного предельного значения. Результаты этого теста являются, прежде всего, показателем высокого качества сырья — антирабической сыворотки, используемой для дальнейшего выделения иммуноглобулиновой фракции. Риск отклонений значений данного показателя от нормативных требований обусловлен гемолизом эритроцитов на этапах кровопускания у лошадей-продуцентов и последующего сепарирования эритроцитов при получении плазмы, что может быть связано с неполадками технологического

оборудования, а также нарушениями в приготовлении и добавлении буферных растворов. Немаловажное значение имеет и физиологическое состояние продуцентов, которое определяется питанием, содержанием и наследственными факторами. Тщательное соблюдение всех требований промышленного регламента, обеспечение круглогодичного полноценного рациона питания и внедрение системы мониторинга гематологических показателей лошадей-продуцентов позволило добиться стабильно низкого значения этого показателя. Безусловно, применение оригинальной модульной системы очистки и осветления раствора антирабического иммуноглобулина с использованием современных фильтроматериалов обеспечивает дополнительную коррекцию показателей цветности благодаря очистке полуфабриката от возможных остатков гемпигментов [2].

Контрольная карта индивидуальных значений для показателя «Цветность» (рис. 2) также подтвердила, что поле рассеяния значений показателя находится в пределах границы нормы 0,15, соответствие для данной объединенной выборки обеспечено; наблюдается тренд убывания значений X в сторону снижения.

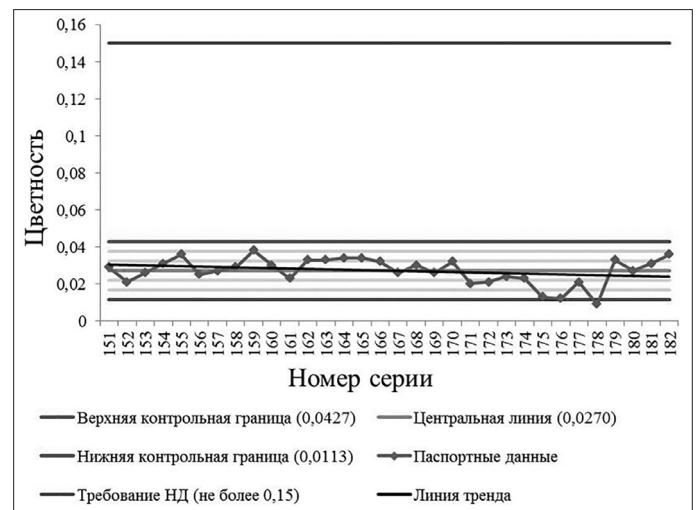


Рис. 2. X-карта индивидуальных значений для показателя «Цветность»

Значения показателей качества «Прозрачность» и «Цветность» для АИГ разведенного 1:100 за 2016–2021 годы также находились на стабильно низком уровне — от 0,001 до 0,003 ед. ($0,0015 \pm 0,0002$) при нормативном значении 0,05; от 0,001 до 0,004 ($0,0023 \pm 0,0003$) при норме 0,15 соответственно, то есть фактически стремились к нулю. При построении контрольных карт индивидуальных значений (рис 3, 4) было отмечено, что каких-либо тенденций изменения индивидуальных значений во времени не наблюдается.

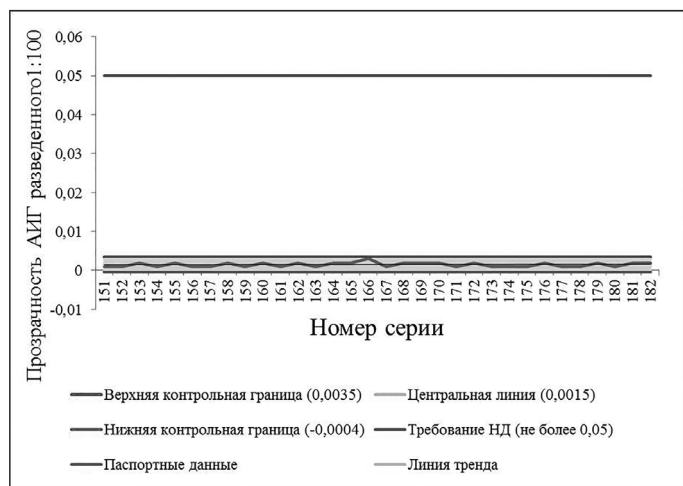


Рис. 3. X-карта индивидуальных значений для показателя «Прозрачность АИГ разведенного 1:100»



Рис. 4. X-карта индивидуальных значений для показателя «Цветность АИГ разведенного 1:100»

Следующие количественные показатели: рН, содержание белка, этилового спирта являются критическими в отношении долгосрочной стабильности антирабического иммуноглобулина в процессе хранения в течение установленного срока годности.

Определение рН проводят потенциометрически в соответствии с ГФ РФ (Государственная фармакопея Российской Федерации), нормативное значение показателя качества «рН» выпущенных за 2016–2021 годы серий колебалось от 6,7 до 7,2 для иммуноглобулина антирабического и от 6,7 до 7,4 — для иммуноглобулина разведенного 1:100. При построении контрольных карт индивидуальных значений рН для иммуноглобулина антирабического (рис. 5) не наблюдается тенденции изменения индивидуальных значений во времени, поле рассеяния показателя качества находится в пределах границ 6,6–7,4, что обеспечивает пригод-

ность процесса для обеспечения заданных требований. В период 2016–2019 гг. с помощью X-карт выявлены признаки наличия «особых» (специальных, неслучайных) причин вариабельности второго рода, но в течение последних двух лет процесс стабилизирован. Для выборки значений показателя качества «рН АИГ разведенного 1:100» (рис. 6) отмечены отдельные критерии выхода процесса из статистически управляемого состояния, наблюдается тренд в сторону верхней границы допуска, расчетное поле рассеяния выходит за пределы 7,4; вероятная доля брака 0,68%, что свидетельствует о необходимости тщательной корректировки рН на уровне медианы (рН=7,0) на финальном этапе приготовления разведенного иммуноглобулина.



Рис. 5. X-карта индивидуальных значений для показателя «рН»



Рис. 6. X-карта индивидуальных значений для показателя «рН АИГ разведенного 1:100»

Содержание белка определяют колориметрическим методом с биуретовым реактивом, с использованием ФСО 3.1.00340 «Стандартный образец содержания белка в

иммуноглобулине» ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ. Нормативное значение показателя качества «Белок» по ФСП находится в пределах от 9 до 11%, среднееголетнее значение показателя качества «Белок» за 2016–2021 годы составило $9,3668 \pm 0,0693\%$. Анализ значений с помощью X-карты (рис. 7) также подтвердил смещение значений X в сторону нижней границы допуска, нахождение расчетного поля рассеяния показателя качества «Белок» за пределом нижней границы, вероятность брака 0,44%.



Рис. 7. X-карта индивидуальных значений для показателя «Белок»

Несмотря на выявленные при статистическом анализе «неблагоприятные» тенденции, имеется экспериментально обоснование вышеобозначенного уровня средних значений показателя белка в готовом продукте, определенное практически 20-летним опытом производства АИГ и разработками в области применения баромембранных технологий. Раствор иммуноглобулина относится к числу вязких труднофильтруемых жидкостей, поэтому при подборе элементов фильтрационного каскада одним из ключевых моментов, лимитирующих их применение, является пропускная способность каждого типа фильтра. При разработке схемы каскадной фильтрации были подобраны оптимальные условия проведения этих процессов, одним из которых является концентрация белкового раствора. Использование раствора концентрацией 9,3–9,5% по белку позволяет наиболее эффективно осуществлять технологические этапы очистки от балластных примесей, осветления, депирогенизации и финишной стерилизации раствора АИГ с целью получения готового продукта, соответствующего показателям качества спецификации. Повышение концентрации фильтруемого раствора значительно увеличивает технологические потери полуфабриката и приводит к нерациональному расходу

дорогостоящих фильтрационных материалов. Кроме того, из-за увеличения вязкости продукта при повышении концентрации белка возникают дополнительные сложности на этапе асептического розлива в первичную упаковку. Таким образом, выпуск АИГ с концентрацией белка $9,4 \pm 0,1\%$ является технологически обоснованной нормой.

Значения показателя качества «Белок АИГ разведенного 1:100» за 2016–2021 годы находятся в диапазоне от 0,039 до 0,115% при нормативном 0,015 до 0,115%. При построении контрольной карты индивидуальных значений наблюдали незначительное возрастание (тренд) значений X в сторону верхней границы допуска (рис. 8); расположение поля рассеяния показателя качества «Белок АИГ разведенного 1:100» за пределом границы 0,115%, расчетное значение вероятности брака составило 13,79%. Вероятно, получение таких результатов не является отражением наличия реальных «особых» причин и указания на дестабилизацию процесса приготовления АИГ разведенного 1:100, а связано с высокой вариабельностью самого метода определения белка при низких концентрациях белковых растворов. Тем не менее следует принять во внимание полученные результаты и усилить надзор на этапе приготовления разведенного иммуноглобулина для исключения возможного выброса за пределы нормативов спецификации.



Рис. 8. X-карта индивидуальных значений для показателя «Белок АИГ разведенного 1:100»

Нормативное значение показателя качества «Спирт этиловый» составляет не более 4,5%. Содержание остаточного спирта в готовом препарате, выпущенном за период 2016–2021 гг., не превышало 3,3%. При производстве АИГ применяют риванол-спиртовый метод, при этом спирт этиловый 96% используется на конечной стадии фракционирования иммунной сыворотки для выделения гамма-глобулиновой фракции. Очистку иммуноглобулина от остатков спиртосодержащих компо-

нентов проводят с помощью диализа на современных разделительных ультрафильтрационных аппаратах против циркуляционного 0,9% раствора натрия хлорида, приготовленного на воде для инъекций. Эта производственная стадия является хорошо отработанным начальным этапом системы каскадной фильтрации, позволяющим надежно очистить полуфабрикат от технологических примесей. С помощью X-карты показано, что процесс находится в границах допуска и является статистически управляемым; тенденции изменения индивидуальных значений во времени не наблюдается; поле рассеяния показателя качества «Спирт этиловый» находится в пределах границы 4,5%, качество соответствия для данных объединенной выборки обеспечено (рис. 9).



Рис. 9. X-карта индивидуальных значений для показателя «Спирт этиловый»

Важнейшим показателем качества иммуноглобулина служит специфическая активность, определяющая в конечном итоге иммунологическую эффективность проводимого антирабического лечения. В соответствии с ФСП Р N 002639/01, титр специфических вируснейтрализующих антител должен быть не менее 150 МЕ/мл в реакции биологической нейтрализации на белых мышах с фиксированным вирусом бешенства штамма «CVS» в количестве 100–500 LD₅₀. Значения показателя качества «Специфическая активность» за 2016–2021 годы составляли от 150 до 276 МЕ/мл, что соответствует требованиям ФСП. При построении контрольной карты индивидуальных значений (рис. 10) наблюдаются критерии нестабильности процесса, расчётное поле рассеяния показателя находится чуть ниже границы 150 МЕ/мл, качество соответствия для данных объединенной выборки не обеспечивается, вероятность брака 1,16%. В то же время в последние годы наблюдается устойчивый

тренд возрастания значений X показателя качества «Специфическая активность». Некоторый спад уровня специфической активности, наблюдаемый в период 2016–2019 годов, был обусловлен увеличением возраста основного поголовья продуцентов, и, как следствие, снижением иммунологической реактивности доноров в ответ на введение рабического антигена. В 2018–2019 годах был проведен комплекс мероприятий по обновлению стада лошадей-продуцентов, и к 2020 году, благодаря введению в эксплуатацию молодых животных, удалось добиться значительного повышения уровня вируснейтрализующей активности антирабической сыворотки. Увеличение специфической активности АИГ приводит к снижению дозы вводимого пациенту гетерологичного препарата и, как следствие, позволяет уменьшить риски развития побочных реакций.



Рис. 10. X-карта индивидуальных значений для показателя «Специфическая активность»

Оценка корреляционной связи между результатами выпускающего контроля качества производителя и испытаний в ИЛ с помощью коэффициента корреляции Пирсона, ранжированного по шкале Чеддока, показала высокий уровень корреляция практически для всех показателей качества, за исключением трех из них — «Белок», «Прозрачность АИГ разведенного 1:100», «Цветность», которые характеризовались умеренной корреляцией (табл. 2). Вышеизложенное свидетельствует о сопоставимости результатов контроля готового препарата производителем по показателям качества и подтверждения соответствия требованиям ФСП в ИЛ. Полученные данные можно учитывать при выборе схем подтверждения соответствия и определении показателей спецификации, по которым

проводятся испытания в рамках процедуры выпуска серий в гражданский оборот.

Таблица 2

Оценка корреляционной связи между результатами выпускающего контроля и ИЛ

№ п/п	Показатель качества	Коэффициент корреляции	Сила корреляционной связи
1	Прозрачность	0,7877	Высокая
2	Цветность	0,3989	Умеренная
3	рН	0,7154	Высокая
4	Белок	0,6475	Заметная
5	Спирт этиловый	0,9733	Весьма высокая
6	Специфическая активность	0,8315	Высокая
Реагенты, выпускаемые в комплекте с препаратом: иммуноглобулин разведенный 1:100			
7	рН	0,9485	Весьма высокая
8	Прозрачность	0,6669	Заметная
9	Цветность	0,7437	Высокая
10	Белок	0,8701	Высокая

Заключение

Сделаны следующие выводы:

1. Обосновано применение статистического анализа многолетних показателей качества ИЛП «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий» с использованием контрольных карт Шухарта, как дополнительного инструмента для оценки стабильности процесса производства и управления качеством.

2. Ретроспективный анализ качества коммерческих серий иммунобиологического лекарственного препарата «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий», произведенных в период с 2016 по 2021 гг. подтвердил стабильность производства продукции, соответствующей требованиям нормативной документации по всем показателям спецификации.

3. Оценка корреляционной связи результатов контроля качества ИЛП производителем и подтверждения соответствия в испытательной лаборатории свидетельствует об обоснованности сокращения объема испытаний ИЛП «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий» при вводе в гражданский оборот.

Литература

1. Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Мовсесянц А.А., Жулидов И.М. Бешенство и антирабические имму-

нобиологические препараты: от прививки Пастера к современным биотехнологиям // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2019. — Т. 96. — № 5. — С. 83–94.

2. Абрамова Е.Г. Совершенствование биотехнологии производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина: автореф. дис. ... доктора биологических наук. — Оболенск, 2018. — 50 с.
3. Васильев А.Н., Реутская Л.А., Байдуллаева Ш.А., Горячев Д.В., Гавришина Е.В., Ниязов Р.Р. Качество лекарственных препаратов. Суть вопроса и зарубежный опыт // Ремедиум. — 2014. — № 10. — С. 14–27.
4. Мовсесянц А.А., Оленин Ю.В. Современные проблемы вакцинопрофилактики бешенства // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. — 2019. — Т. 19. — № 1. — С. 10–16.
5. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. N 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза».
6. Сафиуллина Р.А., Гармонов С.Ю., Горюнова С.М. Подходы по проведению обзора качества лекарственных средств в соответствии с правилами GMP // Вестник Казанского технологического университета. — 2012. — Т. 15. — № 9. — С. 252–255.
7. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. контрольные карты Шухарта. ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. — Н., 2015г.
8. Статистические методы. Статистическое представление данных. Точечная оценка и доверительный интервал для среднего. ГОСТ Р 50779.22- 2005 (ИСО 2602:1980). — Н., 2005 г.
9. Чарыков А.К. Математическая обработка результатов химического анализа: Учеб. пособие для вузов. — Л.: Химия, 1984. — 168 с.
10. Электронный ресурс. — Режим доступа: https://elar.urfu.ru/bitstream/10995/36131/1/solonin_1_2014.pdf/ Солонин С.И. Метод контрольных карт: Учебное пособие. — Екатеринбург, 2014. — 214 с. (дата обращения 28.08.2022).
11. Электронный ресурс. — Режим доступа: <https://exceltable.com/funkcii-excel/koefficient-korrelyacii-pirsona/> (дата обращения 30.11.2022).
12. Электронный ресурс. — Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/rabies/> (дата обращения 09.12.2022).

References

1. Abramova YeG, Nikiforov AK, Movsesyants AA, Zhulidov IM. Beshenstvo i antirabicheskiye immunobiologicheskiye preparaty: ot privivki Pastera k sovremennym biotekhnologiyam. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 2019; 96(5):83–94 (in Russian).

2. Abramova YeG. Sovershenstvovaniye biotekhnologii proizvodstva geterologichnogo antirabicheskogo immunoglobulina: avtoref dis ... doktora biologicheskikh nauk. Obolensk, 2018: 50 (in Russian).
3. Vasil'yev AN, Reutskaya LA, Baydullayeva ShA, Goryachev DV, Gavrishina YeV, Niyazov RR. Kachestvo lekarstvennykh preparatov. Sut' voprosa i zarubezhnyy opyt. *Remedium* 2014(10):14–27 (in Russian).
4. Movsesyants AA, Olefir YuV. Sovremennyye problemy vaksinoprofilaktiki beshenstva. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lecheniye* 2019; 19(1):10–16 (in Russian).
5. Resheniye Soveta Yevraziyskoy ekonomicheskoy komissii ot 3 noyabrya 2016 g. N 77 «Ob utverzhdenii Pravil nadlezhashchey proizvodstvennoy praktiki Yevraziyskogo ekonomicheskogo soyuza» (in Russian).
6. Safullina RA, Garmonov SYu, Goryunova SM. Podkhody po provedeniyu obzora kachestva lekarstvennykh sredstv v sootvetstvii s pravilami GMP. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta* 2012; 15(9):252–255 (in Russian).
7. Statisticheskiye metody. Kontrol'nyye karty. Chast' 2. kontrol'nyye karty Shukharta. GOST R ISO 7870-2-2015. N., 2015 (in Russian).
8. Statisticheskiye metody. Statisticheskoye predstavleniye dannykh. Tochehnaya otsenka i doveritel'nyy interval dlya srednego. GOST R 50779.22- 2005 (ISO 2602:1980). N., 2005 (in Russian).
9. Charykov AK. Matematicheskaya obrabotka rezul'tatov khimicheskogo analiza: Ucheb posobiye dlya vuzov. Leningrad: Khimiya, 1984: 168 (in Russian).
10. Elektronnyy resurs. URL: https://elar.urfu.ru/bitstream/10995/36131/1/solonin_1_2014.pdf/ Solonin S.I. Metod kontrol'nykh kart: Uchebnoye posobiye. – Yekaterinburg, 2014: 214 (data of access 28.08.2022) (in Russian).
11. Elektronnyy resurs. URL: <https://exceltable.com/funkcii-excel/koefficient-korrelyacii-pirsona/> (data of access 30.11.2022) (in Russian).
12. Elektronnyy resurs. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/rabies/> (data of access 09.12.2022) (in Russian).

ANALYSIS OF TRENDS IN QUALITY INDICATORS OF DOMESTIC ANTI-RABIES IMMUNOGLOBULIN FROM HORSE BLOOD SERUM LIQUID AS AN ELEMENT OF THE QUALITY MANAGEMENT SYSTEM AT THE MANUFACTURING COMPANY

A.A. SAVENKOVA¹, O.A. LOBOVIKOVA¹, E.G. ABRAMOVA^{1,2}, I.V. SHULGINA¹, S.V. GENERALOV¹, A.S. FESKOVA¹, S. S. GALETOVA¹, A.K. NIKIFOROV^{1,2}

¹ Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rospotrebnadzor,

² Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov, Saratov

The Russian Federation is classified as a country with an average risk of human infection with rabies. During post-exposure treatment to prevent human rabies in combination with rabies vaccine, rabies immunoglobulin is used. In our country, the only producer of rabies immunoglobulin is the Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe». Statistical analysis of long-term quality indicators of immunobiological drug «Anti-rabies immunoglobulin from horse serum liquid» using Shewhart control maps, as well as analysis of correlations between the data of the indicators of the producing quality control enterprise and the testing laboratory confirmed the stability of product manufacturing that meet the requirements of regulatory documentation for all indicators of the specification.

Keywords: rabies immunoglobulin, quality indicators, Shewhart control maps, correlation coefficient.

Address:

Savenkova A.A.

Junior research associate, department of standardization, quality and metrology, Russian Anti-Plague Institute

«Microbe» of Rospotrebnadzor

E-mail: savencova.vita@gmail.com

Для цитирования:

Савенкова А.А., Лобовикова О.А., Абрамова Е.Г., Шульгина И.В., Генералов С.В., Феськова А.С., Галетова С.С., Никифоров А.К. Анализ тенденций показателей качества отечественного Иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади жидкого как элемента системы менеджмента качества на предприятии-производителе. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2023; 19(1):41–50.

For citation:

Savenkova A.A., Lobovikova O.A., Abramova E.G., Shulgina I.V., Generalov S.V., Feskova A.S., Galetova S.S., Nikiforov A.K. Analysis of trends in quality indicators of domestic anti-rabies immunoglobulin from horse blood serum liquid as an element of the quality management system at the manufacturing company. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(1):41–50 (in Russian).

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

А.А. КУРИЛОВА^{1*}, И.И. КОЧИШ², Л.Ю. КАРПЕНКО¹, О.О. БАБИЧ³, И.Н. НИКОНОВ²

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», Санкт-Петербург;

² ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологий — МВА им. К.И. Скрябина», Москва;

³ ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта», Калининград

В статье приведены результаты исследования на лабораторных животных токсикологических свойств (острой токсичности) новой кормовой добавки на основе лекарственных растений Калининградской области. В ходе исследования было установлено, что скармливание кормовой добавки в дозировках 10, 100, 1000 и 5000 мг/кг не вело к гибели животных. Применение кормовой добавки на протяжении периода наблюдения за животными не вызывало достоверных изменений в морфологических и биохимических анализах крови по отношению к контрольной группе, что свидетельствует об отсутствии острого токсического действия фитобиотического комплекса.

Ключевые слова: лекарственные растения, биологически активные вещества, природные антиоксиданты, острая токсичность, экстракты растений.

Введение

Продуктивность сельскохозяйственных животных во многом определяется не только технологиями выращивания и содержания, но и применением кормовых добавок, способствующих реализации в полной мере генетического потенциала животных. Поиск, разработка и исследование полного спектра фармако-токсикологических характеристик новых кормовых добавок необходимы при установлении эффективных дозировок для практического применения [5]. Экстракты лекарственных растений являются перспективным сырьем, используемым с целью разработки новых продуктов для сельскохозяйственных животных, что объясняется входящими в состав растений витаминами, амфипатическими соединениями (а именно: фенольными соединениями — фенольными кислотами, флавоноидами, катехинами и др.) [14]. В понятие «фе-

нольные соединения» входит более 8000 соединений, разделенных на 12 подклассов [4]. Широкий спектр активностей (противовоспалительная, геропротекторная, антитромботическая и другие) обусловлен главным образом вовлечением фенольных соединений в процесс нейтрализации активных форм кислорода [15].

Антиоксидантная активность фенольных соединений объясняется тем, что атом водорода из ароматической гидроксильной группы может быть легко отдан свободному радикалу. Флавоноиды и другие фенольные соединения проявляют антиоксидантные свойства в большом количестве химических реакций: удаление пероксильных радикалов, алкилпероксильных радикалов, супероксидов, гидроксильных радикалов, пероксинитритов в водных и органических средах [7]. Флавоноиды участвуют в прямом поглощении активных форм кислорода, ингибировании образования активных форм кислорода посредством хелатирования с микроэлементами (примером может служить квертицин, который способен связывать и стабилизировать ионы железа), или ингибировании ферментов, катализирующих реакции с образованием свободных радикалов (например, микросомальная монооксигеназа, митохондриальная сукциноксидаза), увеличении активности антиоксидантных ферментов. Ранее было показано, что флавоноиды обладают противовирусным действием, блокируя процессы прикрепления

© 2023 г. Курилова А.А., Кочиш И.И., Карпенко Л.Ю., Бабич О.О., Никонов И.Н.

* **Автор для переписки:**

Курилова Анастасия Андреевна

соискатель кафедры биохимии и физиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», Санкт-Петербург

E-mail: aakurilova95@yandex.ru.

вируса к клеткам, проникновения во внутриклеточное пространство, репликации и высвобождения вируса из клетки [16]. Имеются данные о противовоспалительном действии флавоноидов, опосредованных ингибированием киназ, воздействующих на ряд сигнальных путей: фосфоинозитол-3-киназа, протеинкиназа С, фосфатидилинозитолкиназа и др. Также сообщалось, что флавоноиды способны регулировать активность протеинкиназа за счет ингибирования фактора транскрипции (например, NF- κ B, регулирующий активность некоторых цитокинов, хемокинов, факторов клеточной адгезии, участвующих в воспалении) [10]. Многие полифенолы (ресвератрол, катехины, полифенольные экстракты, эпигаллокатехин) способствуют снижению уровня глюкозы в крови и увеличению секреции инсулина в клетках поджелудочной железы [13]. Полифенольные экстракты обладают антибактериальным действием в отношении патогенной микрофлоры: предполагается взаимодействие с белками клеточной стенки бактерии, что вызывает повреждение бактериальных мембран и их проницаемость, нарушение осмоса клетки, отток внутриклеточных компонентов и дальнейшую гибель клетки [13].

Кормовые добавки на основе растительных экстрактов получили широкое распространение в животноводстве, а также в рамках преодоления антибиотикорезистентности, в силу антибактериальной активности, входящих в кормовые добавки биологически активных веществ. Кроме того, растительные экстракты стимулируют аппетит, процессы пищеварения, что приводит к увеличению конверсии корма и набору живой массы [12]. Биологическая активность веществ растений зависит от качественного и количественного состава вторичных метаболитов лекарственных растений, который не является постоянным и зависит от климатических условий региона, химического состава почв, экологической обстановки территорий произрастания [9, 11].

Восточно-Балтийский регион характеризуется мягким климатом. Климатические особенности данного региона позволяют предположить высокую концентрацию биологических веществ в растениях [14]. Для практического использования требуется, чтобы разработанные кормовые добавки отвечали всем критериям безопасности, не обладали раздражающим, кумулятивным эффектом. В связи с этим необходимым является проведение ряда доклинических исследований по изучению общетоксического действия новых кормовых добавок.

Целью данного исследования является изучение острой токсичности кормовой добавки на основе экстрактов лекарственных растений Калининградской области,

разработанной на базе Института живых систем ФГАОУ ВО «БФУ им. И. Канта».

Материалы и методы

В ходе исследования проводили изучение на лабораторных животных острого токсического действия кормовой добавки на основе экстрактов лекарственных растений Калининградской области. В состав кормовой добавки входили следующие вещества из расчета г/кг корма: растительные экстракты ладьяна трехнадрезанного (*Corallorhiza trifida*) – 15,0, любки зеленоцветковой (*Platanthera chlorantha*) – 12,5, любки двулистной (*P. bifolia*) – 12,5, лунника оживающего (*Lunaria rediviva*) – 9,0, синеголовника приморского (*Eryngium maritimum*) – 15,0, гудайеры ползучей (*Goodyera repens*) – 15,0; никотиновая кислота (В3) – 1,5; пантотеновая кислота (витамин В5) – 2,0; треонин – 0,1; лизин кормовой – 0,3; метионин – 0,1; дрожжи кормовые – 10,0; лютеолин 3,4'-диглюкозид – 1,0. Исследования проводили согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», а также по ГОСТ Р ИСО 10993-11-2009 [2, 3]. Эксперименты на лабораторных животных проводились согласно Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 года) [8].

Исследования проводились на лабораторных белых крысах (самцах) линии «Уистар» в возрасте 2 месяцев (животные приобретены в Федеральном государственном унитарном предприятии «Питомник лабораторных животных «РАППОЛОВО»). Живая масса животных в опыте составляла в среднем 160 г. Общее количество животных в опыте составляло 50 голов. Предварительно перед началом эксперимента крыс выдерживали на карантине в течение 7 суток в отдельном помещении. Во время карантина проводили клинический осмотр каждого животного. В эксперименте использовались клинически здоровые животные. Для проведения исследования по изучению острого токсического действия животные были распределены на 5 групп по 10 животных в каждой группе: 4 подопытные и 1 контрольная. Крысам-самцам четырех подопытных групп вводилась кормовая добавка внутрижелудочно с помощью шприца и иглы с булавовидным утолщением на конце в дозировках 10, 100, 1000 и 5000 мг/кг, что соответствовало 1,6 мг, 16 мг, 160 мг, 800 мг на животное. Крысам-самцам контрольной группы вводили дистиллированную воду в той же дозировке, что и препарат подопытным животным. Наблюдение

за животными проводили на протяжении 7 суток. Учитывалось общее состояние, потребление корма и воды,

состояние шерстного покрова, поведение и активность. Схема эксперимента представлена в таблице 1.

Таблица 1

Схема исследования острой токсичности разработанной кормовой добавки

Группа	Вид, пол животных	Кол-во животных в группе	Препарат (вариант опыта)	Дозировка	Объем раствора для введения, мг/животное	Режим введения
1 подопытная	Крысы- самцы массой 160 г	10	Разработанная кормовая добавка	10 мг/кг	1,6	Внутрижелудочно, однократно
2 подопытная	Крысы- самцы массой 160 г	10	Разработанная кормовая добавка	100 мг/кг	16	Внутрижелудочно, однократно
3 подопытная	Крысы- самцы массой 160 г	10	Разработанная кормовая добавка	1000 мг/кг	160	Внутрижелудочно, однократно
4 подопытная	Крысы- самцы массой 160 г	10	Разработанная кормовая добавка	5000 мг/кг	800	Внутрижелудочно, однократно
5 контрольная	Крысы- самцы массой 160 г	10	Вода дистиллированная (контрольное вещество)		0,5	Внутрижелудочно, однократно

Расчет значения LD50 проводился методом пробит-анализа; для статистического сравнения полученных значений LD50 использовали тест линейности, тест параллелизма и тест равенства дисперсий. При обработке данных по динамике прироста массы тела статистический анализ данных проводили методом вариационной статистики с помощью простого сравнения средних по двухстороннему t-критерию Стьюдента. Различия определяли при 0,05 уровне значимости [6]. В целом в данном исследовании использовали 50 крыс (опытных и контрольных). Класс опасности препарата определяли согласно ГОСТ 12.1.007–76 [1]. На протяжении эксперимента у животных проводился забор крови (при помощи вакуумных пробирок Improvacuter, Guangzhou Improve Medical Instruments, Китай). Морфологические показатели крови исследовали на автоматическом гематологическом анализаторе ABX Micros 60 (Horiba, Франция). Исследование биохимических показателей проводили на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Clima MC-15 (компания RAL, Испания) с помощью коммерческих наборов реактивов АО «Диакон –ДС» (Производство Россия, г. Пущино).

Результаты и обсуждения

Результаты введения разработанной кормовой добавки в различных концентрациях самцам крыс представлены в таблице 2. Исходя из полученных результатов, следует, что введение кормовой добавки в дозировках 10, 100, 1000 и 5000 мг/кг не вызывало гибели животных на всем протяжении эксперимента. Таким образом, разработанную кормовую добавку следует отнести к 4 классу

токсичности по ГОСТ 12.1.007–76 (малоопасные или нетоксичные вещества).

Таблица 2

Сохранность крыс-самцов после введения кормовой добавки на основе экстрактов лекарственных растений Калининградской области (n=40)

Доза препарата (мг/кг)	Число крыс в опыте	Число погибших крыс после однократного введения препарата в различных дозировках							Сохранность, %
		1	2	3	4	5	6	7	
10	10	0	0	0	0	0	0	0	100
100	10	0	0	0	0	0	0	0	100
1000	10	0	0	0	0	0	0	0	100
5000	10	0	0	0	0	0	0	0	100

На протяжении эксперимента проводили взвешивание крыс. Результаты исследования представлены в таблице 3. Из приведенной ниже таблицы следует, что наиболее интенсивный прирост живой массы отмечался у группы животных, получавших кормовую добавку в дозировке 100 мг/кг — прирост живой массы составил порядка 44,03% по отношению к исходной массе. Живая масса крыс-самцов, получавших кормовую добавку в дозировке 100 мг/кг была выше значений контрольной группы на 7-е сутки с момента начала эксперимента на 27,18%.

На 7-е сутки с момента начала исследования проводили забор крови у подопытных и контрольных животных, исследование морфологических и биохимических параметров крови. Результаты представлены в таблицах 4–5.

Таблица 3

Динамика прироста живой массы тела у крыс-самцов после внутрижелудочного введения разработанной кормовой добавки в остром опыте ($M \pm m$; $n=10$)

№	Дозировка, мг/кг	Масса (г) после введения через (суток)				
		0	1	3	7	Увеличение к исходной живой массе тела, %
1	10	158,67±3,11	203,36±2,65	212,18±3,09	219,15±3,32	38,11±1,98
2	100	155,27±3,48	201,55±3,79	207,29±3,67	223,63±3,69*	44,03±2,67*
3	1000	162,34±2,76	197,33±3,06	209,18±2,95	208,68±3,14	26,69±4,67
4	5000	157,36±3,15	187,63±3,26	211,38±2,59	207,36±2,56	31,77±2,15
5	Контрольное вещество	160,36±2,56	200,15±2,89	204,36±3,98	215,87±1,38	34,62±3,89

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($p \leq 0,05$ при t-критическом 2,21)

Таблица 4

Влияние биологически активной добавки из экстрактов растений Калининградской области на морфологические показатели крови крыс-самцов на 7-е сутки эксперимента ($M \pm m$; $n=10$)

Показатель		Дозировка, мг/кг в сутки				Контроль
		10	100	1000	5000	
Лейкоциты, 10^9 /л		15,28±0,78	17,03±1,36	18,74±2,78	18,36±2,26	14,34±1,36
Эритроциты, 10^{12} /л		6,14±0,07	6,03±0,08	6,21±0,24	6,18±2,59	6,26±0,21
Гемоглобин, г/л		141,2±4,88	140,81±6,4	139,52±6,26	141,25±5,28	140,30±2,37
Гематокрит, %		37,11±1,36	37,90±1,03	37,81±1,65	37,59±1,74	37,85±1,34
Тромбоциты, 10^9 /л		247,44±23,25	255,15±11,34	278,22±19,72	282,58±21,16	311,4±15,66
Тромбокрит, %		0,27±0,01	0,23±0,01	0,23±0,01	0,25±0,01	0,28±0,01
Корпускулярный объем, 10^{15} /л (фл)		61,71±0,81	59,12±0,39	60,32±0,44	60,29±0,59	60,21±0,88
Среднее содержание HGB в эритроците, пг		21,03±0,91	23,16±1,03	22,15±0,76	22,08±0,85	23,01±0,67
Средняя концентрация HGB в эритроците, г%		37,18±1,13	37,67±1,03	38,12±1,14	37,98±1,22	37,01±1,06
СОЭ, мм/ч		1,86±0,24	1,67±0,31	1,83±0,37	1,79±0,41	1,73±0,36
Базофилы		0	0	0	0	0
Эозинофилы		1,84±0,41	2,03±1,12	1,65±0,47	1,75±0,18	1,69±0,19
Нейтрофилы	Миелоциты	0	0	0	0	0
	Юные	0	0	0	0	0
	Палочкоядерные	1,63±0,22	1,41±0,34	1,79±0,37	1,81±0,46	1,66±0,42
	Сегментоядерные	26,43±1,67	25,32±1,76	23,70±3,13	25,31±2,29	26,11±2,17
Лимфоциты		66,9±0,75	68,1±2,14	71,1±3,34	68,79±2,15	68,4±1,98
Моноциты		1,47±0,19	1,99±0,45	1,56±0,41	1,95±0,57	2,14±0,55

Влияние биологически активной добавки из экстрактов растений Калининградской области на биохимические показатели сыворотки крови крыс-самцов на 7-е сутки эксперимента ($M \pm m$; $n=10$)

Показатель	Дозировка, мг/кг в сутки				Контроль
	10	100	1000	5000	
Общий белок, г/л	69,41±3,13	75,76±2,21*	67,8±3,14	65,34±3,10	69,33±3,03
Альбумины, г/л	25,22±0,46	25,67±0,81	23,99±0,68	22,89±0,57	25,18±0,68
Глобулины, г/л	42,33±3,04	44,84±2,99	42,90±3,46	42,15±1,46	45,91±1,39
Альбумины, %	36,33±2,34	34,93±0,87	34,71±2,41	33,38±2,54	34,59±1,87
Глобулины, %	63,67±2,51	65,28±0,93	66,43±2,13	65,65±1,89	65,55±1,78
Мочевина, ммоль/л	6,44±0,70	7,67±0,61	7,03±0,81	7,15±0,74	6,89±0,37
Азот мочевины, моль/л	3,13±0,24	3,76±0,19	3,59±0,19	3,18±0,25	3,28±0,34
Креатинин, мкмоль/л	46,92±1,19	47,45±1,17	46,18±1,13	46,08±1,35	45,67±1,27
Билирубин, мкмоль/л	3,03±0,45	4,44±0,87	3,89±1,18	3,78±0,82	4,1±0,78
АЛТ, МЕ/л	86,13±8,66	90,18±9,78	87,12±8,24	91,26±7,63	75,66±10,28
АСТ, МЕ/л	237,09±24,16	239,69±30,47	238,12±34,23	241,38±33,26	235,99±38,6
Щелочная фосфатаза, МЕ/л	181,37±30,23	218,52±32,7	219,13±41,12	225,31±28,69	157,56±21,3
Глюкоза, ммоль/л	10,24±0,71	9,78±0,75	9,78±0,66	8,97±0,52	8,85±0,34
Холестерин, ммоль/л	1,47±0,14	1,49±0,08	1,37±0,07	1,35±0,05	1,49±0,11
Кальций, ммоль/л	2,37±0,05	2,46±0,04	2,51±0,07	2,47±0,04	2,58±0,06
Фосфор, ммоль/л	2,22±0,19	2,31±0,21	2,18±0,19	2,07±0,18	2,17±0,16

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($p \leq 0,05$ при t-критическом 2,21)

Данные таблиц 4, 5 свидетельствуют о том, что ежедневное пероральное введение кормовой добавки в течение 7 суток не оказало негативного влияния на морфологические и биохимические показатели крови белых крыс-самцов; показатели подопытных групп не отличались от контрольной группы. Отмечалось увеличение концентрации общего белка у животных, получавших кормовую добавку в дозировке 100 мг/кг — показатель был выше на 1,65% в сравнении с контрольной группой, что может свидетельствовать о стимуляции процессов ассимиляции в организме животных. Это объясняется входящими в состав кормовой добавки биологически активными веществами.

Заключение

В ходе проведенных исследований было установлено, что введение кормовой добавки крысам-самцам в дозировках 10, 100, 1000 и 5000 мг/кг не вызывало гибели животных. Введение кормовой добавки приводило к увеличению живой массы крыс-самцов, при этом наи-

более интенсивно набирали массу животные, получавшие кормовую добавку в дозировке 100 мг/кг. Живая масса крыс-самцов во 2-й подопытной группе увеличилась на 44,03% по отношению к исходной живой массе. Необходимо отметить, что живая масса крыс-самцов, получавших кормовую добавку в дозировке 100 мг/кг, была выше значений контрольной группы на 7-е сутки с момента начала эксперимента на 27,18%.

Введение кормовой добавки на протяжении периода наблюдения за животными не вызывало достоверных изменений в морфологических и биохимических анализах крови по отношению к контрольной группе, что свидетельствует об отсутствии острого токсического действия фитобиотического комплекса. Отмечено, что животные, получавшие кормовую добавку в дозировке 100 мг/кг, имели более высокий уровень общего белка — показатели превышали значения у контрольной группы на 1,65%. Разработанная кормовая добавка хорошо переносилась животными на протяжении эксперимента. Полученные результаты являются основанием для дальнейших доклинических и клинических исследований.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (номер соглашения 22-16-00044).

Литература

- ГОСТ 12.1.007–76. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности: Межгосударственный стандарт: издание официальное: утвержден и введен в действие постановлением Госстандарта СССР от 10 марта 1976 г. № 579: дата введения 01.01.77. — Москва: Стандартиформ, 2014. — 5 с.
- ГОСТ Р ИСО 10993-11-2009. Изделия медицинские оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследования общетоксического действия — Medical devices. Biological evaluation of medical devices. Part 11. Tests for systemic toxicity: межгосударственный стандарт: издание официальное: утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 октября 2009 г. N 460-ст: дата введения 01.09.2010. — Москва: Стандартиформ, 2013. — 27 с.
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая/ под ред. А.Н. Миронова. — М.: ГрифиК, 2012. — 944 с.
- Bernal J. et al. Advanced analysis of nutraceuticals // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. — 2011. — Vol. 55. — No. 4. — P. 758–774.
- Bokhan P.D., Bahta A.A., Karpenko L.Yu. et al. Antioxidant system characteristics in saanen goats depending on performance // Journal of Animal Science. — 2020. — Vol. 98. — No. S4. — P. 461–462.
- Dadarkar S.S., Deore M.D., Gatne M.M. Comparative evaluation of acute toxicity of ivermectin by two methods after single subcutaneous administration in rats // Regulatory Toxicology and Pharmacology. — 2007. — Vol. 47(3). — P. 257–260.
- Duthie G., Crozier A. Plant-derived phenolic antioxidants // Current Opinion Clinical Nutrition and Metabolic Care. — 2000. — Vol. 3. — P. 447–451.
- European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes: Strasbourg, 18.III.1986. Text amended according to the provisions of the Protocol (ETS No. 170) as of its entry into force on 2 December 2005.
- Georgii E. et al. Relationships between drought, heat and air humidity responses revealed by transcriptome-metabolome co-analysis // BMC Plant biology. — 2017. — Vol. 17. — No. 1. — Art. 120. doi: 10.1186/s12870-017-1062-y.
- Hou D.X., Kumamoto T. Flavonoids as protein kinase inhibitors for cancer chemoprevention: Direct binding and molecular modeling // Antioxidants Redox Signal. — 2010. — Vol. 13. — No. 5. — P. 691–719.
- Jaakola L., Hohtola A. Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants // Plant, Cell and Environment. — 2010. — Vol. 33. — No. 8. — P. 1239–1247.
- Kuralkar P., Kuralkar S.V. Role of herbal products in animal production — An updated review // Journal of Ethnopharmacol. — 2021. — Vol. 278. — No. 5. — Art. 114246. doi: 10.1016/j.jep.2021.114246.
- Mucha P. et al. Overview of the antioxidant and anti-inflammatory activities of selected plant compounds and their metal ions complexes // Molecules. — 2021. — Vol. 26. — No. 16. — Art. 4886. doi: 10.3390/molecules26164886.
- Sukhikh S. et al. Chemical composition and content of biologically active substances found in *Cotinus coggygria*, *Dactylorhiza maculata*, *Platanthera chlorantha* growing in various territories // Plants. — 2021. — Vol. 10. — No. 12. — Art. 2806. doi: 10.3390/plants10122806.
- Wu S. et al. Phenolic profiles and antioxidant activities of free, esterified and bound phenolic compounds in walnut kernel // Food Chemistry. — 2021. — Vol. 350. — No. 11. — Art. 129217. doi:10.1016/j.foodchem.2021.129217.
- Zhang X. et al. Flavonoids as potential antiviral agents for porcine viruses // Pharmaceutics. — 2022. — Vol. 14. — No. 9. — Art. 1793. doi: 10.3390/pharmaceutics14091793.

References

- GOST 121007–76 Sistema standartov bezopasnosti truda Vrednyye veshchestva Klassifikatsiya i obshchiye trebovaniya bezopasnosti: Mezghosudarstvennyy standart: izdaniye ofitsial'noye: utverzhden i vveden v deystviye postanovleniyem Gosstandarta SSSR ot 10 marta 1976 g № 579: data vvedeniya 010177. Moskva: Standartinform, 2014: 5 (in Russian)
- GOST R ISO 10993-11-2009 Izdeliya meditsinskiye otsenka biologicheskogo deystviya meditsinskikh izdeliy Chast' 11 Issledovaniya obshchetoksicheskogo deystviya — Medical devices Biological evaluation of medical devices Part 11 Tests for systemic toxicity: mezghosudarstvennyy standart: izdaniye ofitsial'noye: utverzhden i vveden v deystviye Prikazom Federal'nogo agentstva po tekhnicheskomu regulirovaniyu i metrologii ot 20 oktyabrya 2009 g N 460-st: data vvedeniya 01092010. Moskva: Standartinform, 2013: 27 (in Russian)
- Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv Chast' pervaya/ pod red AN Mironova Moscow: GrifK, 2012: 944 (in Russian)
- Bernal J et al. Advanced analysis of nutraceuticals. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2011; 55(4):758–774.
- Bokhan PD, Bahta AA, Karpenko LYu et al. Antioxidant system characteristics in saanen goats depending on performance. Journal of Animal Science 2020; 98(S4):461–462.
- Dadarkar SS, Deore MD, Gatne MM. Comparative evaluation of acute toxicity of ivermectin by two methods after single subcutaneous administration in rats. Regulatory Toxicology and Pharmacology 2007; 47(3):257–260.

7. Duthie G, Crozier A. Plant-derived phenolic antioxidants. *Current Opinion Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2000; 3:447–451.
8. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes: Strasbourg, 18.III.1986. Text amended according to the provisions of the Protocol (ETS No 170) as of its entry into force on 2 December 2005.
9. Georgii E et al. Relationships between drought, heat and air humidity responses revealed by transcriptome-metabolome co-analysis. *BMC Plant biology* 2017; 17(1):120. doi: 10.1186/s12870-017-1062-y.
10. Hou DX, Kumamoto T. Flavonoids as protein kinase inhibitors for cancer chemoprevention: Direct binding and molecular modeling. *Antioxidants Redox Signal* 2010; 13(5):691–719.
11. Jaakola L, Hohtola A. Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. *Plant, Cell and Environment* 2010; 33(8):1239–1247.
12. Kuralkar P, Kuralkar SV. Role of herbal products in animal production – An updated review. *Journal of Ethnopharmacol* 2021; 278(5):114246. doi: 10.1016/j.jep.2021.114246
13. Mucha P et al. Overview of the antioxidant and anti-inflammatory activities of selected plant compounds and their metal ions complexes. *Molecules* 2021; 26(16):4886. doi: 10.3390/molecules26164886.
14. Sukhikh S et al. Chemical composition and content of biologically active substances found in *Cotinus coggygria*, *Dactylorhiza maculata*, *Platanthera chlorantha* growing in various territories. *Plants* 2021; 10(12):2806. doi: 10.3390/plants10122806.
15. Wu S et al. Phenolic profiles and antioxidant activities of free, esterified and bound phenolic compounds in walnut kernel. *Food Chemistry* 2021; 350(11):129217. doi:10.1016/j.foodchem.2021.129217.
16. Zhang X et al. Flavonoids as potential antiviral agents for porcine viruses. *Pharmaceutics* 2022; 14(9):1793. doi: 10.3390/pharmaceutics14091793.

STUDYING THE TOXICOLOGICAL PROPERTIES OF A FEED ADDITIVE BASED ON MEDICINAL PLANT EXTRACTS ON LABORATORY ANIMALS

A.A. KURILOVA¹, I.I. KOCHISH², L. Yu. KARPENKO¹, O.O. BABICH³, I.N. NIKONOV²

¹ *St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, St. Petersburg;*

² *Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA named after V.I. K.I. Scriabin, Moscow;*

³ *Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Baltic Federal University named after I. Kant», Kaliningrad*

The article presents the results of a study on laboratory animals the toxicological properties (acute toxicity) of a new feed additive based on medicinal plants of the Kaliningrad region. During the study, it was found that the introduction of feed additives in dosages of 10, 100, 1000 and 5000 mg/kg did not cause the death of animals. The introduction of the feed additive during the period of observation of the animals did not cause significant changes in the morphological and biochemical blood tests in relation to the control group, which indicates the absence of an acute toxic effect of the phytobiotic complex.

Keywords: medicinal plants, biologically active substances, natural antioxidants, acute toxicity, plant extracts.

Address:

Kurilova A.A.

Competitor of the department of biochemistry and physiology,
St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, St. Petersburg
E-mail: aakurilova95@yandex.ru.

Для цитирования:

Курилова А.А., Кочиж И.И., Карпенко Л.Ю., Бабич О.О., Никонов И.Н. Изучение токсикологических свойств кормовой добавки на основе экстрактов лекарственных растений на лабораторных животных. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(1):51–57.

For citation:

Kurilova A.A., Kochish I.I., Karpenko L.Yu., Babich O.O., Nikonov I.N. Studying the toxicological properties of a feed additive based on medicinal plant extracts on laboratory animals. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2023; 19(1):51–57 (in Russian).

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ, ЖЕЛЕЗА, ЦИНКА И НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ПРИ ОТДЕЛЬНОМ И СОВМЕСТНОМ ПРИМЕНЕНИИ

В.В. АЛИПОВ*, О.Г. ШАПОВАЛ, М.А. ПОЛИДАНОВ, И.Е. КОНДРАШКИН, И.С. БЛОХИН, И.Ш. РАСУЛОВ, В.А. КАРСАКОВ, Т.А. ТИРБУЛАТОВ, А.Г. МУСАЕЛЯН, А.И. АЛИПОВ

Саратовский государственный медицинский университет им В.И. Разумовского, Саратов

Целью настоящего исследования явилась оценка антибактериальной активности наночастиц железа, меди, цинка и низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) как отдельно, так и в сочетании друг с другом в отношении стандартных штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий. Для оценки сочетанного действия наночастиц и НИЛИ стандартные штаммы *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *Escherichia coli* ATCC 25922 (M-17) и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835 при микробной нагрузке 10^4 КОЕ/мл в течение часа инкубировали при температуре 37°C в двукратном разведении мясо-пептонным бульоном рабочих растворов наночастиц железа, меди, цинка и их комбинированного раствора с последующим пятиминутным облучением и мерным высевом для подсчета выросших колоний. Установлено, что в условиях 60-минутного воздействия наночастицы меди, цинка и железа при отдельном применении снижают количество клеток *S. aureus* FDA 209P и *E. coli* ATCC 25922 (M-17). В отношении *P. aeruginosa* ATCC 27835 подобное действие отмечено только для наночастиц меди. Под действием НИЛИ существенно снижается количество жизнеспособных клеток штамма *P. aeruginosa* ATCC 27835 и потенцируется антимикробная активность наночастиц цинка и железа в отношении этого же вида. Комбинированный раствор наночастиц подавляет все три опытных штамма, но действие НИЛИ не способствует ни усилению, ни ослаблению этого действия. Сочетанное воздействие лазера и наночастиц цинка, железа, меди как отдельно, так и в составе комбинированного раствора оказывает стимулирующее влияние на выживаемость клеток *S. aureus*, однако значение КОЕ сохраняется ниже контрольных.

Ключевые слова: наночастицы цинка; наночастицы меди; наночастицы железа; низкоинтенсивное лазерное излучение; антибактериальная активность.

Введение

Распространение устойчивости бактерий к антимикробным химиопрепаратам диктует необходимость поиска альтернативных способов подавления микроорганизмов. Некоторые нозологические формы гнойно-воспалительных заболеваний (абсцессы, раны, маститы) в качестве важного этапа терапии подразумевают местную антимикробную обработку, в том числе с применением наночастиц металлов и низкоинтенсивного лазерного

излучения для усиления антимикробного эффекта [4, 5, 12, 18, 25].

Поэтому целью проведенного исследования послужила оценка антибактериальной активности наночастиц меди, цинка, железа и НИЛИ как отдельно, так и в сочетании друг с другом. Бактерии относились к числу основных возбудителей гнойных инфекций перед их применением *in vivo* (на модели гнойных маститов у животных).

Материалы и методы

Нанопорошки, используемые для приготовления суспензии, получены методом плазменной перекомденсации в электродуговых реакторах в лаборатории Акционерного общества «Государственный ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений». Суспензии наночастиц металлов концентрацией 1 мг/мл готовили с использованием ультразвукового гомо-

© 2023 г. Алипов В.В., Шаповал О.Г., Полиданов М.А., Кондрашкин И.Е., Блохин И.С., Расулов И.Ш., Карсаков В.А., Тирбулатов Т.А., Мусаелян А.Г., Алипов А.И.

* Автор для переписки:

Алипов Владимир Владимирович
доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, заведующий кафедрой оперативной хирургии и топографической анатомии, Саратовский государственный медицинский университет им В.И. Разумовского, Саратов
E-mail: vladimiralipov@yandex.ru

генизирования на основе 0,24%-ного водного раствора препарата для внутривенного введения — интралипида в лаборатории на базе кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии ФГБОУ ВО Саратовского медицинского университета им. В.И. Разумовского Минздрава России. Применение интралипида способствует усилению воздействия НИЛИ на клетки бактерий ввиду более равномерного распределения лазерного потока в среде [1–3].

Антибактериальную активность наночастиц металлов определяли методом двукратных серийных разведений в мясо-пептонном бульоне (МПБ) в отношении стандартных штаммов *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *Escherichia coli* ATCC 25922 (M-17) и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835 при микробной нагрузке 5×10^5 КОЕ/мл. При работе принимали во внимание методические рекомендации МР 1.2.2566-09 «Оценка безопасности наноматериалов in vitro и в модельных системах in vivo».

Для изучения сочетанного действия наночастиц и излучения на опытные штаммы их суточные агаровые культуры суспензировали в стерильном физиологическом растворе хлорида натрия, суспензии инокулировали в пробирки с мясопептонным бульоном, содержащим двукратные разведения рабочего раствора наночастиц, раствор интралипида с облучением и без него. В качестве контролей использовали посевы в мясо-пептонном бульоне. Микробная нагрузка составила 10^4 КОЕ/мл. Через 1 час после инокуляции и инкубирования в термостате

при $t 37^\circ\text{C}$ подлежащие облучению опытные варианты подвергали действию лазера в течение 5 минут, после чего осуществляли мерные высевы на мясо-пептонный агар. Облучение проводили с помощью низкоинтенсивного лазера «Матрикс» с рассеивающей головкой и длиной волны 1064 нм в постоянном режиме мощностью 14 Вт/см². Посевы инкубировали в термостате в аэробной атмосфере при $t 37^\circ\text{C}$. Через 24 часа после посева подсчитывали количество выросших колоний. Эксперимент повторяли трижды для расчета средней арифметической от числа выросших колоний и стандартного отклонения от нее ($M \pm m$). Между полученными значениями средних арифметических определяли достоверность различий с вероятностью 95%, используя программу StatTech v. 1.2.0.

Результаты

Установлено, что в отношении штамма стафилококка минимальная бактериостатическая концентрация раствора наночастиц железа и меди составила 0,5, цинка — 0,25, а комбинированного раствора наночастиц — 0,031 мг/мл. Бактерицидная концентрация отмечена только у наночастиц цинка и комбинированного раствора наночастиц и составила 0,5 мг/мл.

Согласно полученным величинам $M \pm m$ (среднего арифметического и стандартного отклонения), значения количества колоний интралипид не оказывает стимулирующего и ингибирующего влияния на все штаммы в данных условиях эксперимента (табл. 1).

Таблица 1

Среднее количество колоний (КОЕ) и стандартное отклонение от него ($M \pm m$) опытных штаммов бактерий во всех условиях эксперимента

Вариант опыта	Количество колоний (посев 0,1мл)			
	<i>S. aureus</i> 209P	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Смесь видов <i>E. coli</i> / <i>P. aeruginosa</i> / <i>S. aureus</i>
Контроль (МПБ)	920±40	798±8	978±36	478±70
Интралипид (0,24%)	839±45	835±46	997±20	480±53
МПБ и 0,24% интралипид	979±19	852±26	981±18*	519±50
0,24% интралипид и НИЛИ	752±18*	954±39	213±31*	614±49
Наночастицы цинка	229±22*	267±56*	990±12	388±32
Наночастицы цинка и НИЛИ	470±51*	131±12*	7±5*	443±19
Наночастицы меди	488±26*	418±16*	522±101*	350±51
Наночастицы меди и НИЛИ	696±21*	424±15*	167±44*	660±38
Наночастицы железа	316±26*	391±8*	771±34*	280±10
Наночастицы железа и НИЛИ	424±16*	299±11*	226±18*	364±116*
Комбинированный раствор наночастиц трех металлов	365±67*	314±13*	238±42*	361±93*
Комбинированный раствор наночастиц трех металлов и НИЛИ	637±55*	321±11*	257±28*	546±74

Примечание: знаком * показано достоверное по сравнению с контролем снижение показателя $M \pm m$ ($p < 0,05$)

Действие лазера как отдельно, так и в сочетании с интралипидом существенно снижает количество жизнеспособных клеток штамма *P. aeruginosa* ATCC 27835; для двух других штаммов достоверных различий в КОЕ для данных условий не установлено.

В условиях 60-минутного воздействия наночастицы меди, цинка и железа при отдельном применении вызывают существенное снижение по сравнению с контролем количества клеток *S. aureus* FDA 209P и *E. coli* ATCC 25922 (M-17). В отношении *P. aeruginosa* ATCC 27835 подобное действие отмечено только для наночастиц меди и, в меньшей степени, — железа. Под действием НИЛИ и каждого из растворов наночастиц значимое снижение количества клеток отмечено только для штамма *P. aeruginosa* ATCC 27835.

Комбинированный раствор наночастиц подавляет все три опытных штамма, но действие НИЛИ не способствует изменению его активности, согласно значениям $M \pm m$, в отношении опытных штаммов грамотрицательных палочек. Сочетанное воздействие лазера и наночастиц цинка, железа, меди как отдельно, так и в составе комбинированного раствора оказывает стимулирующее влияние на выживаемость клеток *S. aureus*; однако значение КОЕ сохраняется ниже контрольных.

При изучении воздействия наночастиц и НИЛИ как отдельно, так и в сочетании друг с другом получен преобладающий рост стафилококка, колонии которого составили 70% всех выделенных из каждого варианта опыта колоний. В целом же изменения количества клеток в этом случае соответствовали указанным выше для отдельных штаммов. С учетом стимулирующего действия НИЛИ на стафилококк сохранилась подавляющая активность наночастиц каждого из металлов и их комбинированного раствора.

Обсуждение

Эффективность воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения на бактерий значительно усиливается при использовании фотосенсибилизаторов или, как указано нами, применением интралипида [6, 7]. Проявление значительного ингибирующего эффекта НИЛИ на штамм *P. aeruginosa* ATCC 27835 в течение пятиминутной экспозиции, как и усиление его при совместном применении с растворами наночастиц, обусловлено способностью псевдомонад образовывать внеклеточные экзополисахариды, которые обладают способностью накапливать железо и другие металлы [15]. Кроме того, даже в условиях избытка железа в окру-

жающей среде псевдомонады синтезируют сидерофоры (например, пиовердин), необходимые для хелатирования и, соответственно, лучшего усвоения железа. Железо в больших концентрациях, как и другие металлы, индуцирует в клетке процессы свободнорадикального окисления, приводящие к гибели [22]. Таким образом, накопление железа внеклеточной слизью псевдомонад способствует захвату его большего количества бактериальной клеткой и более обширному и быстрому повреждению клеточных структур.

Свободно-радикальное окисление различных биомолекул является основным механизмом действия наночастиц металлов на бактерий, но опосредованная им активность зависит от размеров частиц и их степени накопления в клеточных оболочках. В связи с этим наночастицы многих металлов непросто классифицировать на обладающие большей или меньшей антимикробной активностью [10, 11, 13, 16]. Поэтому при использовании смеси металлов повышается вероятность образования кластеров наночастиц, а, следовательно, и увеличение их размеров. Авторы, синтезировавшие комбинированные наночастицы меди и железа, выявили их меньшую антимикробную активность по сравнению с активностью каждого из металлов отдельно (МИК₅₀ оказалась в несколько раз выше, чем у растворов наночастиц одного металла) [14]. И в нашем случае комбинированный раствор наночастиц не проявил большей антимикробной активности против тест-штаммов по сравнению с монорастворами.

Действие низкоинтенсивного лазерного излучения на бактерий также связано с активацией свободно-радикального окисления из-за поглощения фотонов хромофорами (например, порфириносодержащими структурами) бактерий и индукцией сублетальных повреждений ДНК, в том числе у культур в стационарной фазе [8, 17, 19]. Это вызывает снижение количества жизнеспособных клеток в условиях воздействия НИЛИ и его комбинации с наночастицами. Однако рядом авторов отмечен активирующий эффект НИЛИ на ряд грамположительных и грамотрицательных культур, в том числе стафилококков, который они объясняют повышением потребления энергии бактериальной клеткой [20, 21, 23, 24]. В нашем случае отсутствие существенного снижения количества клеток стафилококка при воздействии НИЛИ может быть обусловлено и образованием каротиноидных пигментов, которые являются важными антиоксидантами, инактивируя синглетный кислород и реактивные формы кислорода [9].

Заключение

На основании проведенного исследования сделаны следующие выводы:

1. Действие НИЛИ в использованных параметрах способствует значительному сокращению количества жизнеспособных клеток *P. aeruginosa* ATCC 27835 и активизирует бактерицидную активность опытных растворов наночастиц цинка и железа против данного штамма.

2. Комбинированное воздействие растворов наночастиц каждого из металлов, их комбинированного раствора и НИЛИ в наших условиях эксперимента не способствует усилению антимикробного эффекта наночастиц в отношении штаммов *S. aureus* FDA 209P и *E. coli* ATCC 25922 (M-17).

Литература

1. Алипов В.В., Аванесян Г.А., Мусаелян А.Г., Алипов А.И., Мустафаева Д.Р. Современные проблемы моделирования и лечения абсцессов мягких тканей // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. — 2020. — № 5. — С. 81–86.
2. Алипов В.В., Лебедев М.С., Аванесян Г.А., Мусаелян А.Г., Мустафаева Д.Р., Алипов А.И. Комбинированное хирургическое лечение абсцесса печени в эксперименте // Вестник Российской Военно-медицинской академии. — 2019. — № 51. — С. 21–25.
3. Алипов В.В., Рыхлов А.С., Полиданов М.А., Мусаелян А.Г., Шаповал О.Г., Дудина Е.В., Лобанов М.Е., Блохин И.С., Алипов А.И., Кондрашкин И.Е., Расулов И.Ш., Тахмезов А.Э., Хохлова А.В., Скороход А.А. Способ моделирования отграниченного острого гнойного мастита в эксперименте. Патент РФ 2772397. Оpubл. 19.05.2022. Бюл. № 14. — 10 с.
4. Бабушкина И.В., Мамонова И.А., Гладкова Е.В., Белова С.В., Ульянов В.Ю. Обоснование комплексного подхода к местному лечению гнойно-воспалительных осложнений // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2017. — Т. 3. — № 4. — С. 501–505.
5. Бежин А.И., Липатов В.А., Фрончек Э.В., Григорьян А.Ю., Наимзада М.Д., Лазаренко Е.Д., Медведева М.А. Влияние хитозан-коллагенового комплекса с наночастицами серебра на течение раневого процесса в эксперименте // Человек и его здоровье. — 2019. — № 2. — С. 5–16.
6. Мусаелян А.Г., Полиданов М.А., Кондрашкин И.Е., Тахмезов А.Э., Блохин И.С., Хохлова А.В., Алипов А.И. Моделирование и инновационное лечение инфицированной кисты печени в хирургическом эксперименте // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и Технические Науки. — 2022. — № 7. — С. 162–165.
7. Мусаелян А.Г., Полиданов М.А., Дудина Е.В., Кондрашкин И.Е., Рыхлов А.С., Расулов И.Ш., Блохин И.С., Алипов А.И. Способ комбинированного лечения острого подкожного (нелактационного) гнойного мастита в хирургическом эксперименте // Медицинская наука и образование Урала. — 2022. — Т. 3. — № 23. — С. 110–115.
8. Мосихин С.Б., Безбрызгов А.В., Москвин С.В. Лечение пациентов, страдающих острым бактериальным наружным отитом, с использованием внутривенного освещения крови низкоинтенсивным лазерным излучением с длиной волны 445 нм // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. — 2018. — Т. 95. — № 3. — С. 16–21.
9. Alam M. Antibacterial pyrazoles: tackling resistant bacteria // Future Medicinal Chemistry. — 2022. — Vol. 14. — No. 5. — P. 343–362.
10. Amini S.M. Preparation of antimicrobial metallic nanoparticles with bioactive compounds // Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. — 2019. — Vol. 103. — Art. 109809. doi: 10.1016/j.msec.2019.109809.
11. Antonoglou O., Lafazanis K., Mourdikoudis S., Vourlias G., Lialiaris T., Pantazaki A., Dendrinou-Samara C. Biological relevance of CuFeO₂ nanoparticles: antibacterial and anti-inflammatory activity, genotoxicity, DNA and protein interactions // Materials Science and Engineering. — 2019. — Vol. 99. — P. 264–274.
12. Barbora A., Bohar O., Sivan A.A., Magory E., Nause A., Minnes R. Higher pulse frequency of near-infrared laser irradiation increases penetration depth for novel biomedical applications // PLOS ONE. — 2021. — Vol. 16. — No. 1. — P. 245–350.
13. Canuto K.S., Sergio L.P.S., Guimarães O.R., Geller M., Paoli F., Fonseca A.S. Low-level red laser therapy alters effects of ultraviolet C radiation on *Escherichia coli* cells // Brazilian Journal of Medical and Biological Research. — 2015. — Vol. 48. — No. 10. — P. 939–944.
14. Dixit S., Ahmad I., Hakami A., Gular K., Tedla J.S., Abohashrh M. Comparison of anti-microbial effects of low-level laser irradiation and microwave diathermy on gram-positive and gram-negative bacteria in an in vitro model // Medicina. — 2019. — Vol. 55. — No. 7. — Art. 330. doi: 10.3390/medicina55070330.
15. Donghoon K., Kirienko N.V. Interdependence between iron acquisition and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* // Journal of Microbiology. — 2018. — Vol. 56. — No. 7. — P. 449–457.
16. Hajipour M.J., Fromm K.M., Ashkarran A.A., de Aberasturi Jimenez D., de Larramendi I.R., Serpooshan V.T.R., Parak W.J., Mahmoudi M. Antibacterial properties of nanoparticles // Trends in Biotechnology. — 2012. — Vol. 30. — No. 9. — P. 499–511.
17. Han R.-M., Zhang J.-P., Skibsted L.H. Reaction dynamics of flavonoids and carotenoids as antioxidants // Molecules. — 2012. — Vol. 17. — No. 2. — P. 2140–2160.

18. Hou Y., Yang M., Jiang H., Li D., Du Y. Effects of low-intensity and low-frequency ultrasound combined with tobramycin on biofilms of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) *Escherichia coli* // FEMS microbiology letters. — 2019. — Vol. 366. — No. 3. — P. 20–26.
19. Magana M., Pushpanathan M., Santos A.L., Leanse L., Fernandez M., Ioannidis A., Giulianotti M.A., Apidianakis Y., Bradfute S., Ferguson A.L. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance // The Lancet. Infectious diseases. — 2020. — Vol. 20. — No. 9. — e216–e230. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30327-3.
20. Oliveira D.M.P.D., Forde B.M., Kidd T.J., Harris P.N.A., Schembri M.A., Beatson S.A., Paterson D.L., Walker M.J. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens // Journal of Clinical Microbiology. — 2020. — Vol. 33. — No. 3. — e00181–19. doi: 10.1128/CMR.00181-19.
21. Qiu Y., Hu W., Wen M., Zhao W., Xie J., Zhang J., Wang M., Li H., Zhao Y., Fu S., Rong Z., Yao M., Duan Y., Huang J., Wang Y., Qin J., Wang H., Sun L.Q., Tan R. Low expression of ECT2 confers radiation therapy resistance through transcription coupled nucleolar DNA damage repair // International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics. — 2022. — Vol. 112. — No. 5. — P. 1229–1242.
22. Raghupathi K.R., Koodali R.T., Manna A.C. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles // Langmuir. — 2011. — Vol. 27. — No. 7. — P. 4020–4028.
23. Zhao Q., Zhou K., Wu Z., Yang C., Feng Z., Cheng H., Gan J., Peng M., Yang Z., Xu S. Near quantum-noise limited and absolute frequency stabilized 1083 nm single-frequency fiber laser // Optics Letters. — 2018. — Vol. 43. — No. 1. — P. 42–45.
24. Zharov V.P., Menyayev Y.A., Kabisov R.K., Al'kov S.V., Nesterov A.V., Savrasov G.V. Design and application of low-frequency ultrasound and its combination with laser radiation in surgery and therapy // Critical Reviews in Biomedical Engineering — 2011. — Vol. 29. — No. 3. — P. 502–519.
25. Zharov V.P., Menyayev Y.A., Kabisov R.K., Al'kov S.V., Nesterov A.V., Savrasov G.V. Study on the design and application of combining low-frequency ultrasound with laser radiation in surgery and therapy // Critical Reviews in Biomedical Engineering. — 2017. — Vol. 45. — No. 6. — P. 153–170.
3. Alipov VV, Rykhlov AS, Polidanov MA, Musayelyan AG, Shapoval OG, Dudina YeV, Lobanov MYe, Blokhin IS, Alipov AI, Kondrashkin IYe, Rasulov ISH, Takhmezov AE, Khokhlova AV, Skorokhod AA. Sposob modelirovaniya otgranichennogo ostrogo gnoynogo mastita v eksperimente. Patent RF 2772397. Opubl 19.05.2022. Byul № 14. 10 s (in Russian).
4. Babushkina IV, Mamonova IA, Gladkova YeV, Belova SV, Ul'yanov VYu. Obosnovaniye kompleksnogo podkhoda k mestnomu lecheniyu gnoyno-vospalitel'nykh oslozhneniy. Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy 2017; 3(4):501–505 (in Russian).
5. Bezhin AI, Lipatov VA, Fronchek EV, Grigor'yan AYU, Naimzada MD, Lazarenko YeD, Medvedeva MA. Vliyaniye khitozan-kollagenovogo kompleksa s nanochastitsami serebra na techeniye ranevogo protsessa v eksperimente. Chelovek i yego zdorov'ye 2019; 2:5–16 (in Russian).
6. Musayelyan AG, Polidanov MA, Kondrashkin IYe, Takhmezov AE, Blokhin IS, Khokhlova AV, Alipov AI. Modelirovaniye i innovatsionnoye lecheniye infitsirovannoy kisty pecheni v khirurgicheskom eksperimente. Sovremennaya nauka: aktual'nyye problemy teorii i praktiki. Seriya: Yestestvennyye i Tekhnicheskiye Nauki 2022; 7:162–165 (in Russian).
7. Musayelyan AG, Polidanov MA, Dudina YeV, Kondrashkin IYe, Rykhlov AS, Rasulov ISH, Blokhin IS, Alipov AI. Sposob kombinirovannogo lecheniya ostrogo podkozhnogo (nelaktatsionnogo) gnoynogo mastita v khirurgicheskom eksperimente. Meditsinskaya nauka i obrazovaniye Urala 2022; 3(23):110–115 (in Russian).
8. Mosikhin SB, Bezbryazov AV, Moskvina SV. Lecheniye patsiyentov, stradayushchikh ostrym bakterial'nym naruzhnym otitom, s ispol'zovaniyem vnutrivennogo osveshcheniya krovi nizkointensivnym lazernym izlucheniym s dlinoy volny 445 nm. Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoy fizicheskoy kul'tury 2018; 95(3):16–21 (in Russian).
9. Alam M. Antibacterial pyrazoles: tackling resistant bacteria. Future Medicinal Chemistry 2022; 14(5):343–362.
10. Amini SM. Preparation of antimicrobial metallic nanoparticles with bioactive compounds. Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl 2019; 103:109809. doi: 10.1016/j.msec.2019.109809.
11. Antonoglou O, Lafazanis K, Mourdikoudis S, Vourlias G, Lialiaris T, Pantazaki A, Dendrinou-Samara C. Biological relevance of CuFeO₂ nanoparticles: antibacterial and anti-inflammatory activity, genotoxicity, DNA and protein interactions. Materials Science and Engineering 2019; 99:264–274.
12. Barbora A, Bohar O, Sivan AA, Magory E, Nause A, Minnes R. Higher pulse frequency of near-infrared laser irradiation increases penetration depth for novel biomedical applications. PLOS ONE 2021; 16(1):245–350.
13. Canuto KS, Sergio LPS, Guimarães OR, Geller M, Paoli F, Fonseca AS. Low-level red laser therapy alters effects of ultra-

References

1. Alipov VV, Avanesyan GA, Musayelyan AG, Alipov AI, Mustafayeva DR. Sovremennyye problemy modelirovaniya i lecheniya abstsessov myagkikh tkaney. Khirurgiya. Zhurnal im NI Pirogova 2020; 5:81–86 (in Russian).
2. Alipov VV, Lebedev MS, Avanesyan GA, Musayelyan AG, Mustafayeva DR, Alipov AI. Kombinirovannoye khirurgicheskoye lecheniye abstsessa pecheni v eksperimente.

- violet C radiation on *Escherichia coli* cells. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2015; 48(10):939–944.
14. Dixit S, Ahmad I, Hakami A, Gular K, Tedla JS, Abohashrh M. Comparison of anti-microbial effects of low-level laser irradiation and microwave diathermy on gram-positive and gram-negative bacteria in an in vitro model. Medicina 2019; 55(7):330. doi: 10.3390/medicina55070330.
 15. Donghoon K, Kirienko NV. Interdependence between iron acquisition and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Microbiology 2018; 56(7):449–457.
 16. Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, de Aberasturi Jimenez D, de Larramendi IR, Serpooshan VTR, Parak WJ, Mahmoudi M. Antibacterial properties of nanoparticles. Trends in Biotechnology 2012; 30(9):499–511.
 17. Han R-M, Zhang J-P, Skibsted LH. Reaction dynamics of flavonoids and carotenoids as antioxidants. Molecules 2012; 17(2):2140–2160.
 18. Hou Y, Yang M, Jiang H, Li D, Du Y. Effects of low-intensity and low-frequency ultrasound combined with tobramycin on biofilms of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) *Escherichia coli*. FEMS microbiology letters 2019; 366(3):20–26.
 19. Magana M, Pushpanathan M, Santos AL, Leanse L, Fernandez M, Ioannidis A, Giulianotti MA, Apidianakis Y, Bradfute S, Ferguson AL. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. The Lancet. Infectious diseases 2020; 20(9):e216–e230. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30327-3.
 20. Oliveira DMPD, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, Paterson DL, Walker MJ. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. Journal of Clinical Microbiology 2020; 33(3):e00181–19. doi: 10.1128/CMR.00181-19.
 21. Qiu Y, Hu W, Wen M, Zhao W, Xie J, Zhang J, Wang M, Li H, Zhao Y, Fu S, Rong Z, Yao M, Duan Y, Huang J, Wang Y, Qin J, Wang H, Sun LQ, Tan R. Low expression of ECT2 confers radiation therapy resistance through transcription coupled nucleolar DNA damage repair. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics 2022; 112(5):1229–1242.
 22. Raghupathi KR, Koodali RT, Manna AC. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. Langmuir 2011; 27(7):4020–4028.
 23. Zhao Q, Zhou K, Wu Z, Yang C, Feng Z, Cheng H, Gan J, Peng M, Yang Z, Xu S. Near quantum-noise limited and absolute frequency stabilized 1083 nm single-frequency fiber laser. Optics Letters 2018; 43(1):42–45.
 24. Zharov VP, Menyaev YA, Kabisov RK, Al'kov SV, Nesterov AV, Savrasov GV. Design and application of low-frequency ultrasound and its combination with laser radiation in surgery and therapy. Critical Reviews in Biomedical Engineering 2011; 29(3):502–519.
 25. Zharov VP, Menyaev YA, Kabisov RK, Al'kov SV, Nesterov AV, Savrasov GV. Study on the design and application of combining low-frequency ultrasound with laser radiation in surgery and therapy. Critical reviews in biomedical engineering 2017; 45(6):153–170.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF COPPER, IRON AND ZINC NANOPARTICLES AND LOW-LEVEL LASER RADIATION IN THEIR SEPARATE AND COMBINED APPLICATION

V.V. ALIPOV, O.G. SHAPOVAL, M.A. POLIDANOV, I.E. KONDRASHKIN, I.S. BLOKHIN, I.Sh. RASULOV, V.A. KARSAKOV, T.A. TIRBULATOV, A.G. MUSAELYAN, A.I. ALIPOV

Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov

The aim of this study was to assess the antibacterial activity of the iron, copper, zinc nanoparticles and low-level laser radiation (LLLR) both individually and in combination with each other against the standard bacterial strains. For this purpose, 10^4 CFU/ml of the standard strains of *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *Escherichia coli* ATCC 25922 (M-17) and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835 were incubated at the temperature 37 °C in two-fold dilutions of the iron, copper, zinc nanoparticles solutions and their combined solution in meat-pepton broth. In one hour of the incubation the dilutions were treated with LLLR and measurably inoculated to calculate isolated colonies. The study determined that under the conditions of 60 minutes exposure the copper, zinc and iron nanoparticles reduce the cell number of *S.aureus* and *E.coli*. For the strain *P. aeruginosa* such action was observed only for the copper nanoparticles. Under influence of LLLR amount of alive *P. aeruginosa* cells was significantly decreased and antimicrobial activity of the iron, zinc nanoparticles against this species was stimulated. The combined solution of the nanoparticles inhibited all tested strains, but LLLR did not strengthen or weaken this action. The combined action of LLLR and the nanoparticles either alone or in the combined solution stimulated surviving of *S. aureus* cells, but CFU remained lower than their control values.

Keywords: zinc nanoparticles; copper nanoparticles; iron nanoparticles; low-level laser radiation; antibacterial activity.

Address:

Alipov V.V., Doctor of Medical Sciences,
Professor, Academician of the Russian Academy of Natural Sciences,
head of the department of operative surgery and topographic anatomy,
Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov
E-mail: vladimiralipov@yandex.ru

Для цитирования:

Алипов В.В., Шаповал О.Г., Полиданов М.А., Кондрашкин И.Е., Блохин И.С., Расулов И.Ш., Карсаков В.А., Тирбулатов Т.А., Мусаелян А.Г., Алипов А.И. Антибактериальная активность наночастиц меди, железа, цинка и низкоинтенсивного лазерного излучения при отдельном и совместном применении. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(1):58–64.

For citation:

Alipov V.V., Shapoval O.G., Polidanov M.A., Kondrashkin I.E., Blokhin I.S., Rasulov I.Sh., Karsakov V.A., Tirbulatov T.A., Musaelyan A.G., Alipov A.I. Antibacterial activity of copper, iron and zinc nanoparticles and low-level laser radiation in their separate and combined application. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(1):58–64 (in Russian).

АКТУАЛЬНОСТЬ ИЗУЧЕНИЯ ИЕРСИНИОЗНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

А.О. АНОПРИЕНКО*, Н.Е. ГАЕВСКАЯ, М.П. ПОГОЖОВА, А.В. ТЮРИНА

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

Представлен обзор исторических и современных сведений о явлении бактериофагии в контексте исследования иерсиниозов. Обе эти проблемы рассмотрены по отдельности и в совокупности. Акцент ставился на фаготерапию и фагопрофилактику. В последнее время исследователи стали уделять внимание и фагодиагностике и дезинфекции с использованием бактериофагов. Тема чумной бактериофагии подробно проанализирована. В ней выстроены приоритеты, дан исторический аспект в отношении динамики интересов специалистов к изучению этого вопроса: в том числе в плане ориентации деятельности специалистов ФКУЗ Ростовский на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора на изучение как иерсиниозных бактериофагов, так и проблемы бактериофагии в целом. Сотрудниками института были выделены и охарактеризованы бактериофаги разных видов патогенных бактерий. В настоящее время исследования иерсиниозных и других фагов особо опасных инфекций продолжаются с целью расширения коллекции-депозитария бактериофагов с известными биологическими и молекулярно-генетическими свойствами.

Ключевые слова: иерсиниозные бактериофаги, общие проблемы бактериофагии, фаги особо опасных инфекций.

Введение

Общие сведения об иерсиниозах

Иерсиниозы — группа острых инфекционных заболеваний, отличающихся разнообразием клинической картины и склонностью к хроническому рецидивирующему течению, возбудителями которых являются микроорганизмы рода *Yersinia* семейства *Enterobacteriaceae*. В странах Европы псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз занимают третье место среди зоонозных кишечных инфекций. В нашей стране наиболее высокие показатели заболеваемости псевдотуберкулезом характерны для Сибирского региона, Дальнего Востока и Северо-Запада, включая Санкт-Петербург [17, 46].

Инфекции, вызываемые *Yersinia pseudotuberculosis*, носят эпидемический, групповой или спорадический характер и характеризуются полиморфной симптоматикой. Согласно данным литературы, в последние годы в Финляндии и Канаде отмечаются спорадические случаи псевдотуберкулеза, а в России (Дальний Восток) и Японии заболевание имеет эпидемический характер и протекает в более тяжелой форме.

Псевдотуберкулез является актуальной проблемой здравоохранения и с 1991 года включен в национальный перечень регистрируемых заболеваний. Многие авторы отмечают, что истинный уровень заболеваемости псевдотуберкулезом, ее структура и динамика на территории Российской Федерации до конца не определены, что обусловлено несовершенством клинических подходов в распознавании инфекции. Диагностирование псевдотуберкулеза затруднено и за счет существования большого разнообразия клинических проявлений — интоксикация, лихорадка, поражение кожи, нередко происходит генерализация инфекции с вовлечением в патологический процесс различных систем органов: желудочно-кишечного тракта, опорно-двигательного аппарата и других. Заболевание протекает с различной степенью тяжести и может иметь как острую, так и хроническую формы. Выявлено, что отсутствие адекватной терапии, а также нарушения в иммунном статусе способствуют рецидиву и частой хронизации инфекционного процесса [34].

Клинические формы кишечного иерсиниоза довольно разнообразны. Характерными признаками данного заболевания являются нарушения деятельности желудочно-кишечного тракта: энтероколит, энтерит. Менее распространенные формы инфекции — это ангина и вторичные очаги воспаления. Нередко заболевание протекает в септической форме, которая приводит к миокардиту, а также сопровождается артритом, воспалением коленных и голеностопных суставов. Смертность от генерализованной формы кишечного иерсиниоза достигает 30–60%. Довольно редко возникает вторично-очаговая форма за-

© 2023 г. Аноприенко А.О., Гаевская Н.Е., Погожова М.П., Тюрина А.В.

* Автор для переписки:

Аноприенко Анна Олеговна

м.н.с. лаб. бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

E-mail: nuga.anoprienko.1985@gmail.com

болевания, которая чаще всего проявляется поражением суставов (артриты), сердечной мышцы (миокардит), щитовидной железы (аутоиммунный тиреоидит), редко — поражением оболочек мозга (менингит) [8, 35].

Yersinia pestis — возбудитель чумы, который обладает тенденцией к эпидемическому и пандемическому распространению; причем, как правило, с высокой летальностью, что явилось основанием для выделения чумы в группу особо опасных инфекций. Из-за высокой инфекционности и летальности *Y. pestis* рассматривается как агент биотерроризма первого уровня [37].

Чуму считают проблемой прошлого, возвращение которой маловероятно. Однако регистрировать новые случаи заболевания чумой продолжают ежегодно: в Азии — Казахстан, Туркменистан, Узбекистан, Монголия, Китай, а также в Демократической Республике Конго, Индии, Мадагаскаре, Мозамбике, Уганде и Танзании. На Западе — в Бразилии, Боливии, Перу, Эквадоре и США находятся постоянно действующие природные очаги чумы.

Последняя крупная вспышка чумы произошла на Мадагаскаре в 2017 году, где у многих пациентов развивалась легочная форма.

В связи с имеющимися стертыми и атипичными формами иерсиниозов, а также схожестью клинических симптомов с другими инфекционными болезнями есть основание предполагать, что заболевания, вызываемые патогенными иерсиниями, встречаются значительно чаще, чем диагностируются [29, 44].

Течение инфекций, вызываемых бактериями *Yersinia*, усугубляется существованием антибиотикорезистентных клинических штаммов, делая традиционное лечение этих инфекций неэффективным. Устойчивость *Y. pestis* к антибиотикам встречается редко, но представляет собой серьезную международную угрозу [6, 36, 43]. Так, например, в 1990-е годы на Мадагаскаре были выделены два полиантибиотикорезистентных штамма *Y. pestis*, один из которых был невосприимчив к антибиотикам, рекомендованным для лечения и профилактики чумы. Также имеются и данные литературы о выделении антибиотикорезистентных штаммов *Y. pseudotuberculosis* [13, 32].

Заболевания, вызванные антибиотикорезистентными штаммами микроорганизмов, характеризуются более тяжелой клинической картиной, в результате чего чаще требуется госпитализация больного и увеличивается продолжительность пребывания его в стационаре. В связи с этим происходит увеличение затрат на лечение, ухудшается прогноз для здоровья и жизни пациентов, а также все вышперечисленное создает условия для возможного возникновения эпидемий.

Всемирная организация здравоохранения в 2001 году опубликовала Глобальную стратегию по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам [10], а в 2017 году генеральный директор ВОЗ Тедрос Адан Гебрейесус сделал заявление о том, что «человечество может остаться без защиты из-за устойчивости бактерий к антибиотикам» и что «устойчивость к антимикробным препаратам является чрезвычайной проблемой для мирового здравоохранения, которая может стать угрозой прогрессу в современной медицине». По заявлению ВОЗ, большинство имеющихся в настоящее время антибактериальных препаратов — это всего лишь «модификации уже существующих классов антибиотиков», что может быть лишь «краткосрочным решением» проблемы. Также ВОЗ подчеркивает, что разработка эффективных средств лечения уже недостаточна и призывает страны улучшить профилактические меры в области здравоохранения. В последние годы Министерство здравоохранения Российской Федерации увеличило поддержку исследований, направленных на сдерживание антибиотикорезистентности. Так, например, Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ) и Федеральный научно-методический центр мониторинга резистентности к антибактериальным препаратам принимают активное участие в разработке стратегических направлений по данной проблеме [9, 26].

В связи с этим растет актуальность применения безопасных биологических объектов для лечения и диагностики заболеваний, повышается интерес к изучению их действия. Одним из таких объектов могут стать бактериофаги.

Феномен бактериофагии: история и современность

Фаги были открыты в 1915 году Фредериком Туортом и независимо в 1917 году Феликсом Д'Эреллем, который и ввел термин — бактериофаги. Д'Эрелль с большим энтузиазмом относился к перспективам фаготерапии и при его личной поддержке в Тбилиси Георгием Элиава был организован Международный институт бактериофагов, позже объединенный с Институтом микробиологии и эпидемиологии. В 1921 г. в Институте Элиава, который имел подразделения не только по разработкам, но и производству лекарственных средств на основе бактериофагов, французские исследователи Брюно и Месон продемонстрировали успешное лечение бактериальных раневых инфекций с помощью фагов. В 1925 году д'Эрелль применил высоковирулентный противочумный фаг для лечения четырех случаев бубонной чумы в качестве первой терапии бактериофагами.

Всем этим больным был поставлен диагноз бубонная чума с очень тяжелыми клиническими проявлениями. Д'Эрель лечил всех четверых больных противочумными фаговыми препаратами путем прямой инъекции фага в бубоны. Все четыре пациента выздоровели [2]. Описаны опыты по применению бактериофагов и для лечения септических заболеваний. Так, Грациа первый успешно применил бактериофаг для лечения стафилококковых септицемий [28]. К началу 1930-х годов фаготерапия приобрела большую популярность во всем мире, фаговые препараты начали производить и продавать несколько ведущих фармацевтических компаний во Франции, Англии и США [24].

«Золотая эпоха» исследования бактериофагов в различных направлениях продолжалась с 1930-х по 1950-е гг. и привела к фундаментальным открытиям (помимо фаготерапии), например, таким как доказательство генетической роли ДНК и расшифровка генетического кода. Далее в 1980–1990-е гг. фаги оказали важнейшее влияние на развитие биотехнологий. Например, технология рекомбинантной ДНК была разработана на основе бактериофагов как первичных векторов или частей векторов, удобных для секвенирования и экспрессии генов, и является одним из основных направлений в генетической инженерии [26].

Также бактериофаги стали источниками открытия и получения большого количества ферментов, включая интегразы, ДНК-лигазы, ДНК-полимеразы, РНК-полимеразы, рекомбиназы, и т.д., которые сейчас используются в молекулярно-биологических лабораториях. Но интерес к бактериофагам не был постоянно высоким, что связано с открытием и широким распространением антибиотиков, а также из-за недостатка финансирования и переключения исследователей на более перспективное изучение эукариотических систем. С 1970-х годов наблюдался спад публикаций работ, связанных с изучением бактериофагов. Основные работы в данной области были выполнены главным образом в Советском Союзе, а также в научных институтах Восточной Европы [24, 41].

К началу 1990-х годов в связи с ростом антибиотикорезистентности микроорганизмов область применения препаратов бактериофагов расширилась и в настоящее время число исследований фагов растет. На сегодняшний день препараты бактериофагов в России стали активно применять в медицине для лечения гнойно-воспалительных заболеваний и осложнений в хирургической практике, гинекологии и акушерстве, офтальмологии, стоматологии, а также ветеринарии, сельском хозяйстве и других областях. Во Франции терапевтическое применение бактериофагов осуществляли немногие врачи,

один из них — J.-F. Vieu, который работал в лаборатории «Service des Enterobacteries» Пастеровского института в Париже. В Польше фаги применял S. Slopek из Института иммунологии и экспериментальной медицины Академии наук. По последним данным, происходит возобновление интереса к фаготерапии и прилагаются усилия, направленные на возрождение практики использования бактериофагов [1, 16].

В настоящее время в исследовательских организациях разных стран мира имеется большое количество бактериофагов, многие из которых исследованы с помощью современных молекулярно-биологических методов. Практика показала, что при выборе бактериофага для лечения конкретного больного необходим широкий поиск в разных коллекциях, так как каждый вид и штамм бактерии характеризуется индивидуальным набором рецепторов для связывания фага.

Механизм инфицирования для разных видов фагов различен. Антибактериальный эффект бактериофагов обусловлен внедрением генома фага в бактериальную клетку, где происходит его дальнейшее размножение и лизис инфицированной клетки. По типу взаимодействия бактериофага с микробной клеткой различают два вида: умеренные и вирулентные (литические) фаги. Литические фаги, попадая в клетку хозяина, способны реплицироваться в ее цитоплазме и вызывать лизис, после чего новые фаговые частицы высвобождаются в окружающую среду. Длительная коэволюция системы фаг-бактерия привела к возникновению умеренных бактериофагов, не лизирующих клетки, что обеспечивает более эффективное сохранение и распространение вида. Некоторые умеренные фаги, попадая в клетку, переходят в лизогенную форму, то есть встраиваются в геном и вместе с генетической информацией хозяина передаются последующим поколениям. При попадании бактерии, содержащей профаг, в определенные условия происходит репликация и созревание бактериофага и дальнейшее разрушение клетки с высвобождением новых фаговых частиц. Умеренные бактериофаги не используют в терапевтических целях во избежание переноса факторов патогенности и генетических маркеров лекарственной устойчивости. Они нашли свое применение для фаготипирования и дифференцировки бактериальных культур, в качестве векторов в геномной инженерии [31, 48].

Фаготерапия. Фагопрофилактика. Дезинфекция с использованием бактериофагов. Фагодиагностика

Существует два подхода при создании препаратов бактериофагов для терапии и профилактики. Первый — это

формирование коктейля бактериофагов, действующих на разные штаммы одного вида патогенного микроорганизма или даже на несколько патогенов, которые участвуют в развитии инфекции определенного типа. Второй вариант фаготерапии и фагопрофилактики предусматривает персонализированный подход, то есть подбор бактериофага против конкретного патогена, обнаруженного у пациента. Какой бы подход ни применялся на практике, препараты бактериофагов не вызывают побочных токсических и аллергических реакций и не имеют противопоказаний. Бактериофаги высокоспецифичны при лечении инфекций, не подавляют нормальную микрофлору организма и не нарушают естественный баланс, а также не имеют противопоказаний к применению: их можно назначать беременным, кормящим матерям и детям любого возраста. Фаги могут оказывать стимулирующее влияние на гуморальный и клеточный иммунитет. Фаговые препараты эффективны как в монотерапии, так и в комбинации с другими препаратами (с антибиотиками и пробиотиками) [7, 21].

Наряду с фагопрофилактикой и фаготерапией, в последние годы сформировалось новое направление использования бактериофагов — биологическая дезинфекция, значительно повышающая эффективность профилактических и противоэпидемических мероприятий. Главным преимуществом биологической дезинфекции является то, что ее можно проводить в присутствии людей. Бактериофаги устойчивы во внешней среде, а также совместимы со многими дезинфицирующими средствами. Широкое применение антибиотиков и химических дезинфицирующих средств способствует распространению так называемых внутрибольничных, или госпитальных, штаммов бактерий, которые отличаются устойчивостью к антимикробным препаратам и обладают высоким эпидемическим потенциалом. Дезинфекция с использованием бактериофагов наиболее целесообразна в отделениях эпидемиологического риска, ожоговых, онкогематологических и других центрах, где применение химических средств ограничено. Также применение бактериофагов связано с невозможностью регулярного освобождения помещений от пациентов, большим количеством сложной медицинской техники, распространением устойчивых к антибиотикам госпитальных штаммов патогенных бактерий [19, 33].

Помимо вышеперечисленного, в лабораторную практику плотно вошла и фагодиагностика. Методы индикации и идентификации микроорганизмов с помощью бактериофагов специфичны, не требуют больших затрат времени, материалов и общедоступны. По данным литературы, идентификация бактерий с использованием бактериофагов представляет собой «очень тонкий метод,

превосходящий по чувствительности все иммунологические реакции». Метод фаготипирования бактерий может быть использован не только в качестве эпизоотологического и эпидемиологического исследований, но и с целью улучшения лабораторной диагностики в качестве метода ускоренной идентификации микроорганизмов [5, 27].

Чумные бактериофаги

Для патогенных представителей рода *Yersinia* также свойственно явление бактериофагии. Их отличительным видовым признаком является неодинаковая лизабельность гомо- и гетерологичными фагами.

Впервые в СССР чумные бактериофаги начала изучать Покровская М.П., которая в 1929 году выделила фаг из тканей, зараженных чумой сусликов *Spermophilus* sp. Литический бактериофаг Покровской М.П. является высокоэффективным в отношении *Y. pestis* и по настоящее время применяется в лабораторной практике в России и странах СНГ для выявления чумного микроба. Исследования по изучению чумных бактериофагов продолжила Марьина Ю.Н.

После некоторого перерыва снова появился интерес к изучению чумных бактериофагов. Так, в ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в период с 1967 по 1976 гг. была изучена псевдолизогения и подтвердили наличие существования у чумного микроба лизогении и умеренных фагов. В 1990 году сотрудниками института Новосельцевым Н.Н. и Марченко В.И. был изолирован новый чумной умеренный фаг «Н» 3-го серотипа из штамма чумного микроба, выделенного от блох [30].

С 1982 по 2015 гг. работами по изучению бактериофагов в Ростовском противочумном институте руководила д.м.н. Кудрякова Т.А. В это время сотрудниками лаборатории были изолированы чумные бактериофаги из различных очагов чумы, а также проведено фаготипирование штаммов чумного микроба. Благодаря применению активных фагов проводили дифференциацию лизогенных штаммов от нелизогенных, что повысило обнаружение фагочувствительных патогенных иерсиний. Успешно внедрены индикаторные штаммы для поиска умеренных фагов, репликация которых находится в строгой зависимости от клетки-хозяина. В Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (Саратов) депонированы штаммы *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* различных сероваров. В результате экспериментов на основе совокупности биологических и морфологических признаков, разработки новых критериев качественной характеристики бактериофагов

патогенных для человека видов иерсиний были получены доказательства биологического разнообразия этой группы бактериальных вирусов, имеющие не только теоретическое, но и важное практическое значение [22, 25].

В настоящее время под руководством к.м.н. Гавевской Н.Е. в лаборатории бактериофагов также проводится научно-исследовательская работа, связанная с выделением и изучением биологических и генетических свойств бактериофагов патогенных для человека видов иерсиний, с пополнением коллекции фагов [3, 4, 20].

Попытки использовать чумной бактериофаг для идентификации возбудителя чумы предпринимались давно. В современной диагностике чумного микроба на практике применяется препарат — «Бактериофаг диагностический чумной Покровской (II)». Наряду с ним также используется и бактериофаг L-413C, который является мутантом, произошедшим от умеренного чумного бактериофага. Фаг L-413C более видоспецифичен в отношении *Y. pestis* среди всех диагностических фагов и не способен к лизису псевдотуберкулезного микроба. Наряду с высокой специфичностью фага L-413C отмечается и его недостаток — существование атипичных штаммов *Y. pestis*, устойчивых к данному фагу. Фагорезистентные штаммы *Y. pestis* были выделены из Среднеазиатского и Тянь-Шанского очагов. Случаи выделения фагорезистентных культур свидетельствуют о том, что возбудитель чумы контактирует с бактериофагом в природных очагах и вероятность циркуляции таких культур в очагах чумы довольно высока, что обуславливает необходимость поиска новых вирулентных фагов [5, 42].

В лабораторной практике чумные бактериофаги применяют и в других странах. Так, например, в Китае для выявления чумного микроба используют выделенный там же бактериофаг *Yer-phi*. Данный фаг не способен лизировать бактерии других видов рода *Yersinia*. В Германии применяются два бактериофага L-413C и φA1122, причем исследователи в своих работах показывают, что фаг L-413C обладает высокой специфичностью к *Y. pestis*, а бактериофаг φA1122 способен лизировать и некоторые штаммы *Y. pseudotuberculosis*. В США для идентификации и диагностики чумы используются бактериофаги φA1122, Покровской и фаг L-413C, а также проводят исследования по производству вакцины против чумы с использованием бактериофагов [41, 50].

Псевдотуберкулезные бактериофаги, в сравнении с чумными, менее изучены. Важными признаками в изучении бактериофагов являются: антигенное строение, спектр литической активности, одиночный цикл развития, морфология фаговых корпускул и негативных колоний, а также устойчивость к различным физическим

и химическим агентам. Исследования по изучению этих признаков, а также и генетических свойств псевдотуберкулезных фагов ныне ведутся не только в медицине, но и в ветеринарии [12, 18, 22, 45].

На постсоветском пространстве для идентификации псевдотуберкулезного микроба использовали фаги d'Herelle-m, R и PST. Они способны лизировать 92–100% штаммов *Y. pseudotuberculosis*, а также большинство штаммов *Y. pestis*. R-бактериофаг (R означает «Русский») также называется бактериофагом Котляровой. На сегодняшний день на практике используют псевдотуберкулезный диагностический бактериофаг, выпускаемый ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Он обладает широким диапазоном действия в отношении возбудителя псевдотуберкулеза, не лизирует микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae*, но лизирует некоторые штаммы *Y. pestis* и поэтому не является строго специфичным. Причем, диагностический бактериофаг лизирует бактерии *Y. pseudotuberculosis* только при температуре культивирования 28–37 °C, но не при 10 °C. Еще один недостаток — его медленная скорость адсорбции, в результате чего возникают и соответствующие сложности в работе с ним [11, 49].

В коллекции-депозитарии лаборатории бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора также собраны охарактеризованные по биологическим и генетическим свойствам псевдотуберкулезные фаги. Данные бактериофаги обладают антигенной специфичностью, так как они в реакции нейтрализации полностью нейтрализуются антифаговыми сыворотками к псевдотуберкулезным фагам и не дают перекрестных реакций с чумными фагами. Псевдотуберкулезные фаги имеют высокий спектр литической активности (50–100%), обладают устойчивостью к хлороформу, к повышенной температуре (погибают при температуре >65 °C). Изученные псевдотуберкулезные фаги по совокупности биологических и генетических свойств обладают высоким потенциалом для использования их в диагностических препаратах [20].

Коммерческих диагностических бактериофагов в отношении *Y. enterocolitica* нет. В настоящее время исследования по применению фагов *Y. enterocolitica* как в России, так и за рубежом сосредоточены на расширении поиска новых рас фагов [38]. По данным литературы в 2018 г., за рубежом впервые были применены фаги *Y. enterocolitica* для обеззараживания продуктов питания и посуды [40, 47].

Сотрудниками ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора также прово-

дятся эксперименты по изучению фагов *Y. enterocolitica*. В разные годы были получены и охарактеризованы по биологическим и генетическим свойствам фаги *Y. enterocolitica*, активные в отношении гомологичных штаммов разных О-сероваров [22, 25]. Изученные бактериофаги обладают широким спектром литической активности (до 90%), относятся к разным серологическим типам и обладают устойчивостью к хлороформу. Теперь проводится секвенирование бактериофагов, которые по биологическим характеристикам являются наиболее перспективными для разработки фаговых препаратов [14, 23].

Заключение

Таким образом, в условиях тотальной антибиотикорезистентности микроорганизмов поиск новых способов борьбы с возбудителями инфекционных заболеваний становится весьма актуальным. Использование бактериофагов в терапевтических и диагностических целях является чрезвычайно перспективным направлением, что и приводит к нарастанию интереса к терапии и диагностике бактериофагами. Именно поэтому весьма актуальными представляются методы получения фагов с заданными свойствами, такими как расширенная специфичность, повышенная литическая активность, способность поражать только те бактерии, которые содержат целевые генетические элементы, например, гены, определяющие лекарственную устойчивость. Поэтому на сегодня остаются важными исследования, касающиеся биологической оценки фагов для использования их в качестве фармацевтических и диагностических препаратов [21, 39].

Работы, направленные на изучение бактериофагов, в том числе и иерсиниозных, проводят сотрудники в ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Нами были выделены и охарактеризованы бактериофаги разных видов патогенных бактерий. В настоящее время исследования иерсиниозных и других фагов особо опасных инфекций продолжают для расширения коллекции-депозитария бактериофагов с известными биологическими и молекулярно-генетическими свойствами, на основе которых могут быть созданы диагностические и лечебно-профилактические препараты.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Алешкин А.В. Исторический обзор опыта применения бактериофагов в России // Медицинский совет. — 2015. — № 7. — С. 12–17.
2. Анисимов А.П., Кингсли К.А. Лечение чумы: перспективные альтернативы антибиотикам // Журнал медицинской микробиологии. — 2006. — Т. 55. — № 11. — С. 1461–1475.
3. Аноприенко А.О., Гаевская Н.Е., Погужова М.П., Торина А.В. Молекулярно-биологические исследования экспериментального бактериофага *Yersinia enterocolitica* 43, перспективного для диагностики и профилактики иерсиниозов // Молекулярная диагностика и биобезопасность-2022: Сборник материалов конгресса с международным участием, Москва, 27–28 апреля 2022 года. — Москва: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2022. — С. 28–30.
4. Аноприенко А.О., Гаевская Н.Е., Погужова М.П., Торина А.В. Сравнительная характеристика биологических свойств бактериофагов *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis* // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. — 2019. — № 37. — С. 77–78.
5. Арутюнов И.А. Сравнительное изучение биологических свойств чумных и псевдотуберкулезных бактериофагов // Генетика, биохимия и иммунохимия особо опасных инфекций. — 1967. — № 1. — С. 382–390.
6. Арутюнов Ю.И., Пичурина Н.Л., Судына Л.В., Трухачев А.Л. Чума в Китае: эпидемиологические и эпизоотические аспекты // Инфекционные болезни: новости. Мнения. Обучение. — 2019. — Т. 8. — № 3(30). — С. 70–77.
7. Власов В.В., Тихунова Н.В., Морозова В.В. Бактериофаги как терапевтические препараты: что сдерживает их применение в медицине // Биохимия. — 2020. — Т. 85. — № 11. — С. 1587–1600.
8. Воскресенская Е.А. и др. Генетические особенности *Yersinia pseudotuberculosis* и эпидемиологические черты групповых заболеваний псевдотуберкулезом в организованных коллективах // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2009. — № 3. — С. 31–34.
9. Гусаров В.Г., Карпов О.Э., Замятин М.Н. Антибиотикорезистентность хирургических инфекций: современное состояние проблемы // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. — 2017. — Т. 12. — № 2. — С. 95–102.
10. Данилов А.И., Жаркова Л.П. Антибиотикорезистентность: аргументы и факты // Клиническая фармакология и терапия. — 2017. — Т. 26. — № 5. — С. 6–9.
11. Дудина Л.Г., Малкова М.А., Бывалов А.А. Разработка методики определения адсорбционной активности иерсиниозных бактериофагов с использованием инактивированных бактерий // Общество. Наука. Инновации (НПК-2017): сборник статей. — Киров: Вятский государственный университет, 2017. — С. 54–59.

12. Дудина Л.Г. и др. Конкуренция псевдотуберкулезного диагностического бактериофага и специфических антител за рецепторы на поверхности *Yersinia pseudotuberculosis* // Общество, наука, инновации (НПК-2015). Сборник материалов. — Киров: Вятский государственный университет, 2015. — С. 122–124.
13. Дудина Л.Г. Иммунохимическая характеристика рецепции бактериями *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis* специфических бактериофагов. Дис. канд. мед. наук. — Киров, 2018. — 146 с.
14. Ефимов Е.И. и др. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. — 2019.
15. Ефимова В.А., Мирских О.В., Бурякова А.А., Пашкова Н.Н., Полушин Н.Н. Конструирование промотор пробных векторов на основе модифицированного гена β-галактозидазы *Escherichia coli* // Биоорг. Хим. — 1989. — Т. 15. — № 1. — С. 90–103.
16. Зефирова Т.П. и др. Микроэкология фагов: политический экскурс // Status Praesens. Гинекология, акушерство, бесплодный брак. — 2018. — № 2. — С. 111–117.
17. Каримова Т.В. Энтеропатогенные иерсинии: микробиологический мониторинг, молекулярно-биологические особенности, алгоритм лабораторной диагностики: дис. канд. мед. наук. — Саратов, 2017. — 163 с.
18. Катмакова Н.П., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Поиск и селекция псевдотуберкулезных бактериофагов // Ветеринарная медицина. — 2009. — № 4. — С. 19–20.
19. Коломиец Э.И., Романовская Т.В., Сверчкова Н.В. Перспективы использования бактериофагов в составе мощных средств с пробиотическим действием // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. — 2020. — Т. 12. — С. 373–388.
20. Кочеткова А.О., Гаевская Н.Е., Погожова М.П. Изучение биологических свойств бактериофагов *Y. pseudotuberculosis* // Актуальные вопросы изучения особо опасных и природно-очаговых болезней. — 2019. — С. 306–309.
21. Красильников И.В. и др. Препараты бактериофагов: краткий обзор современного состояния и перспектив развития // Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. — 2011. — Т. 26. — № 2–2. — С. 33–37.
22. Кудрякова Т.А. и др. Бактериофаги *Yersinia enterocolitica*: обнаружение и идентификация // Клиническая лабораторная диагностика. — 2010. — № 4. — С. 43–45.
23. Кудрякова Т.А. и др. Штамм бактерий *Yersinia enterocolitica*, используемый в качестве индикаторной культуры для выявления умеренных бактериофагов лизогенных штаммов О1, О3, О12 сероваров. — Патент №2425872. — 2011.
24. Летаров А.В. История ранних исследований бактериофагов и рождение основных концепций вирусологии // Биохимия. — 2020. — Т. 85. — № 9. — С. 1189–1212.
25. Македонова Л.Д. и др. Бактериофаги *Yersinia pseudotuberculosis*: обнаружение в штаммах различных О-сероваров и их идентификация // Клиническая лабораторная диагностика. — 2013. — № 8. — С. 52–53.
26. Намазова-Баранова Л.С., Баранов А.А. Антибиотикорезистентность в современном мире // Педиатрическая фармакология. — 2017. — Т. 14. — № 5. — С. 341–354.
27. Погожова М.П., Гаевская Н.Е., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Аноприенко А.О., Тюрина А.В., Зулькарнеев Э.Р. Диагностический бактериофаг «ФБ» для быстрой идентификации *Vibrio cholerae* О139 серогруппы // Проблемы медицинской микологии. — 2021. — Т. 23. — № 2. — С. 128.
28. Покровская М.П., Каганова Л.С., Морозенко М.А. Лечение ран бактериофагом. — М.: Наркомздрав СССР, МЕДГИЗ, 1941. — 54 с.
29. Сергеев В.И. Современные тенденции в многолетней динамике заболеваемости острыми кишечными инфекциями бактериальной и вирусной этиологии // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2020. — Т. 19. — №. 4. — С. 14–19.
30. Титова С.В. и др. Ростовский-на-Дону противочумный институт — 85 лет на страже эпидемиологического благополучия страны // Медицинский вестник Юга России. — 2019. — № 2. — С. 77–82.
31. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. — М.: Наука, 1968. — 168 с.
32. Туякова Р.К. и др. Чувствительность возбудителей кишечного иерсиниоза к противомикробным препаратам // Евразийский Союз Ученых. — 2014. — № 7–3(7). — С. 148–151.
33. Шемякин И.Г., Фирстова В.В., Фурсова Н.К., Абаев И.В., Филиппович С.Ю., Игнатов С.Г., Дятлов И.А. Новые возможности в борьбе с патогенными микроорганизмами // Биохимия. — 2020. — Т. 85. — № 11. — С. 1615–1632.
34. Шихалиева К.Д. и др. Место кишечного иерсиниоза в современной классификации острых кишечных инфекций // Многопрофильный стационар. — 2020. — Т. 7. — № 1. — С. 124–126.
35. Яшникова В.Д., Соколова О.Я. Иерсиния — возбудитель пищевой токсикоинфекции // Современное общество: глобальные и региональные процессы: Материалы VI Международной научной конференции, г. Санкт-Петербург, 16–17 марта 2021 г. — Моррисвилль: Лулу Пресс, 2021. — С. 5–9.
36. Andrianaivoarimanana V. et al. Transmission of antimicrobial resistant *Yersinia pestis* during a pneumonic plague outbreak // Clinical Infectious Diseases. — 2022. — Vol. 74. — No. 4. — P. 695–702.
37. Cote C.K. et al. Protection elicited by attenuated live *Yersinia pestis* vaccine strains against lethal infection with virulent *Y. pestis* // Vaccines. — 2021. — Vol. 9. — No. 2. — Art. 161. doi: 10.3390/vaccines9020161.
38. Hammerl J. et al. Properties of two broad host range phages of *Yersinia enterocolitica* isolated from wild animals // In-

- ternational Journal of Molecular Sciences. — 2021. — Vol. 22. — No. 21. — Art. 11381. doi: 10.3390/ijms222111381.
39. Hess K.L., Jewell C.M. Phage display as a tool for vaccine and immunotherapy development // *Bioengineering & Translational Medicine*. — 2020. — Vol. 5. — No. 1. — e10142. doi: 10.1002/btm2.10142.
 40. Jun J.W. et al. Bacteriophages reduce *Yersinia enterocolitica* contamination of food and kitchenware // *International journal of food microbiology*. — 2018. — Vol. 271. — P. 33–47.
 41. Moses S. et al. Characterization of *Yersinia pestis* phage lytic activity in human whole blood for the selection of efficient therapeutic phages // *Viruses*. — 2021. — Vol. 13. — No. 1. — Art. 89. doi: 10.3390/v13010089.
 42. Moses S. et al. Reporter-phage-based detection and antibiotic susceptibility testing of *Yersinia pestis* for a rapid plague outbreak response // *Microorganisms*. — 2021. — Vol. 9. — No. 6. — Art. 1278. doi: 10.3390/microorganisms9061278.
 43. Rosario-Acevedo R. et al. Plague prevention and therapy: perspectives on current and future strategies // *Biomedicines*. — 2021. — Vol. 9. — No. 10. — Art. 1421. doi: 10.3390/biomedicines9101421.
 44. Rosner B.M. et al. Clinical aspects and self-reported symptoms of sequelae of *Yersinia enterocolitica* infections in a population-based study, Germany 2009–2010 // *BMC infectious diseases*. — 2013. — Vol. 13. — No. 1. — Art. 236. doi: 10.1186/1471-2334-13-236.
 45. Salem M. et al. T4-like bacteriophages isolated from pig stools infect *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* using LPS and OmpF as receptors // *Viruses*. — 2021. — Vol. 13. — No. 2. — Art. 296. doi: 10.3390/v13020296.
 46. Saraka D. et al. *Yersinia enterocolitica*, a neglected cause of human enteric infections in Cote d'Ivoire // *PLoS neglected tropical diseases*. — 2017. — Vol. 11. — No. 1. — e0005216. doi: 10.1371/journal.pntd.0005216.
 47. Schwudke D. et al. Broad-host-range *Yersinia phage* PY100: genome sequence, proteome analysis of virions, and DNA packaging strategy // *Journal of bacteriology*. — 2008. — Vol. 190. — No. 1. — P. 332–342.
 48. Singh A.K., Curtiss III R., Sun W. A recombinant attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* vaccine delivering a *Y. pestis* YopENT138-LcrV fusion elicits broad protection against plague and yersiniosis in mice // *Infection and immunity*. — 2019. — Vol. 87. — No. 10. — e00296-19. doi: 10.1128/IAI.00296-19.
 49. Skurnik M. Molecular genetics, biochemistry and biological role of *Yersinia lipopolysaccharide* / In: Skurnik M., Bengoechea J.A., Granfors K. (eds). *The Genus Yersinia. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 529. — Springer, Boston, MA, 2004. — P. 187–197.
 50. Tao P. et al. A bacteriophage T4 nanoparticle-based dual vaccine against anthrax and plague // *MBio*. — 2018. — Vol. 9. — No. 5. — e01926-18. doi: 10.1128/mBio.01926-18.

References

1. Aleshkin AV. Istoricheskiy obzor opyta primeneniya bakteriofagov v Rossii. *Meditsinskiy sovet* 2015; 7:12–17 (in Russian).
2. Anisimov AP, Kingsli KA. Lecheniye chumy: perspektivnyye al'ternativy antibiotikam. *Zhurnal meditsinskoy mikrobiologii* 2006; 55(11):1461–1475 (in Russian).
3. Anopriyenko AO, Gayevskaya NYe, Pogozhova MP, Tyurina AV. Molekulyarno-biologicheskiye issledovaniya eksperimental'nogo bakteriofaga *Yersinia enterocolitica* 43, perspektivnogo dlya diagnostiki i profilaktiki iyersiniozov. *Molekulyarnaya diagnostika i biobezopasnost'-2022: Sbornik materialov kongressa s mezhdunarodnym uchastiyem, Moskva, 27–28 aprelya 2022 goda*. Moskva: FBUN TSNII Epidemiologii Rospotrebnadzora, 2022: 28–30 (in Russian).
4. Anopriyenko AO, Gayevskaya NYe, Pogozhova MP, Tyurina AV. Sravnitel'naya kharakteristika biologicheskikh svoystv bakteriofagov *Yersinia pseudotuberculosis* i *Yersinia pestis*. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii* 2019; 37:77–78 (in Russian).
5. Arutyunov IA. Sravnitel'noye izucheniye biologicheskikh svoystv chumnykh i psevdotuberkuleznykh bakteriofagov. *Genetika, biokhimiya i immunokhimiya osobo opasnykh infektsiy* 1967; 1:382–390 (in Russian).
6. Arutyunov YuI, Pichurina NL, Sud'ina LV, Trukhachev AL. Chuma v Kitaye: epidemiologicheskiye i epizooticheskiye aspekty. *Infektsionnyye bolezni: novosti. Mneniya. Obucheniye* 2019; 8(3):70–77 (in Russian).
7. Vlasov VV, Tikunova NV, Morozova VV. Bakteriofagi kak terapevticheskiye preparaty: chto sderzhivayet ikh primeneniye v meditsine. *Biokhimiya* 2020; 85(11):1587–1600 (in Russian).
8. Voskresenskaya YeA i dr. Geneticheskiye osobennosti *Yersinia pseudotuberculosis* i epidemiologicheskiye cherty gruppovykh zabo-levaniy psevdotuberkulezom v organizovannykh kolektivakh. *Epidemiologiya i infektsionnyye bolezni* 2009; 3:31–34 (in Russian).
9. Gusarov VG, Karpov OE, Zamyatin MN. Antibiotikorezistentnost' khirurgicheskikh infektsiy: sovremennoye sostoyaniye problemy. *Vestnik Natsional'nogo mediko-khirurgicheskogo tsentra im NI Pirogova* 2017; 12(2):95–102 (in Russian).
10. Danilov AI, Zharkova LP. Antibiotikorezistentnost': argumenty i fakty. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya* 2017; 26(5):6–9 (in Russian).
11. Dudina LG, Malkova MA, Byvalov AA. Razrabotka metodiki opredeleniya adsorbtsionnoy aktivnosti iyersinioznykh bakteriofagov s ispol'zovaniyem inaktivirovannykh bakteriy. *Obshchestvo. Nauka. Innovatsii (NPK-2017): sbornik statey*. Kirov: Vyatskiy gosudarstvennyy universitet, 2017: 54–59 (in Russian).
12. Dudina LG i dr. Konkurentsia psevdotuberkuleznogo diagnosticheskogo bakteriofaga i spetsificheskikh antitel za retseptory na poverkhnosti *Yersinia pseudotuberculosis*. *Obshchestvo, nauka, innovatsii (NPK-2015)*. Sbornik materialov. Kirov: Vyatskiy gosudarstvennyy universitet, 2015: 122–124 (in Russian).

13. Dudina LG. Immunokhimicheskaya kharakteristika retseptsii bakteriyami *Yersinia pseudotuberculosis* i *Yersinia pestis* spetsificheskikh bakteriofagov. Dis kand med nauk. Kirov, 2018: 146 (in Russian).
14. Yefimov YeI i dr. Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii. 2019 (in Russian).
15. Yefimova VA, Mirskikh OV, Buryakova AA, Pashkova HH, Polushin HH. Konstruirovaniye promotor probnykh vektorov na osnove modifitsirovannogo gena β -galaktozidazy *Escherichia coli*. Bioorg Khim 1989; 15(1):90–103 (in Russian).
16. Zefirova TP i dr. Mikroekologiya fagov: politicheskii ekskurs. Status Praesens. Ginekologiya, akusherstvo, besplodnyy brak 2018; 2:111–117 (in Russian).
17. Karimova TV. Enteropatogennyye iyersinii: mikrobiologicheskii monitoring, molekulyarno-biologicheskiiye osobennosti, algoritm laboratornoy diagnostiki: dis kand med nauk. Saratov, 2017: 163 (in Russian).
18. Katmakova NP, Zolotukhin SN, Vasil'yev DA. Poisk i selektsiya psevdotuberkuleznykh bakteriofagov. Veterinarnaya meditsina 2009; 4:19–20 (in Russian).
19. Kolomiyets EI, Romanovskaya TV, Sverchkova NV. Perspektivy ispol'zovaniya bakteriofagov v sostave moyushchikh sredstv s probioticheskim deystviyem. Mikrobnyye biotekhnologii: fundamental'nyye i prikladnyye aspekty 2020; 12:373–388 (in Russian).
20. Kochetkova AO, Gayevskaya NYe, Pogozhova MP. Izucheniye biologicheskikh svoystv bakteriofagov *Y. pseudotuberculosis*. Aktual'nyye voprosy izucheniya osobo opasnykh i prirodno-ochagovykh bolezney 2019: 306–309 (in Russian).
21. Krasil'nikov IV i dr. Preparaty bakteriofagov: kratkiy obzor sovremennogo sostoyaniya i perspektiv razvitiya. Sibirskiy zhurnal klinicheskoy i eksperimental'noy meditsiny 2011; 26(2–2):33–37 (in Russian).
22. Kudryakova TA i dr. Bakteriofagi *Yersinia enterocolitica*: obnaruzheniye i identifikatsiya. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika 2010; 4:43–45 (in Russian).
23. Kudryakova T.A. i dr. Shtamm bakteriy *Yersinia enterocolitica*, ispol'zuyemyy v kachestve indikatornoy kul'tury dlya vyyavleniya umerennykh bakteriofagov lizogennykh shtammov O1, O3, O12 serovarov. Patent № 2425872 2011 (in Russian).
24. Letarov AV. Istoriya rannikh issledovaniy bakteriofagov i rozhdeniye osnovnykh kontseptsiy virusologii. Biokhimiya 2020; 85(9):1189–1212 (in Russian).
25. Makedonova LD i dr. Bakteriofagi *Yersinia pseudotuberculosis*: obnaruzheniye v shtammakh razlichnykh O-serovarov i ikh identifikatsiya. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika 2013; (8):52–53 (in Russian).
26. Namazova-Baranova LS, Baranov AA. Antibiotikorezistentnost' v sovremennom mire. Pediatricheskaya farmakologiya 2017; 14(5):341–354 (in Russian).
27. Pogozhova MP, Gayevskaya NYe, Pisanov RV, Vodop'yanov AS, Anopriyenko AO, Tyurina AV, Zul'karneyev ER. Diagnosticheskii bakteriofag «FB» dlya bystroy identifikatsii *Vibrio cholerae* O139 serogruppy. Problemy meditsinskoy mikologii 2021; 23(2):128 (in Russian).
28. Pokrovskaya MP, Kaganova LS, Morozenko MA. Lecheniye ran bakteriofagom. Moscow: Narkomzdrav SSSR, MEDGIZ, 1941: 54 (in Russian).
29. Sergevnin VI. Sovremennyye tendentsii v mnogoletney dinamike zabolevayemosti ostrymi kischechnymi infektsiyami bakterial'noy i virusnoy etiologii. Epidemiologiya i vaksino-profilaktika 2020; 19(4):14–19 (in Russian).
30. Titova SV i dr. Rostovskiy-na-Donu protivochumnyy institut – 85 let na strazhe epidemiologicheskogo blagopoluchiya strany. Meditsinskiy vestnik Yuga Rossii 2019; 2:77–82 (in Russian).
31. Tikhonenko AS. Ul'trastruktura virusov bakteriy. Moscow: Nauka, 1968: 168 (in Russian).
32. Tuyakova RK i dr. Chuvstvitel'nost' vzbuditeley kischechnogo iyersinioza k protivomikrobnym preparatam. Yevraziyskiy Soyuz Uchenykh 2014; 7–3(7):148–151 (in Russian).
33. Shemyakin IG, Firstova VV, Fursova NK, Abayev IV, Filipovich SYu, Ignatov SG, Dyatlov IA. Novyye vozmozhnosti v bor'be s patogennymi mikroorganizmami. Biokhimiya 2020; 85(11):1615–1632 (in Russian).
34. Shikhaliyeva KD i dr. Mesto kischechnogo iyersinioza v sovremennoy klassifikatsii ostryykh kischechnykh infektsiy. Mnogoprofil'nyy statsionar 2020; 7(1):124–126 (in Russian).
35. Yashnikova VD, Sokolova OYa. Iyersiniya – vzbuditel' pishchevoy toksikoinfektsii. Sovremennoye obshchestvo: global'nyye i regional'nyye protsessy: Materialy VI Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii, g. Sankt-Peterburg, 16–17 marta 2021 g. Morrisvill': Lulu Press, 2021: 5–9 (in Russian).
36. Andrianaivoarimanana V et al. Transmission of antimicrobial resistant *Yersinia pestis* during a pneumonic plague outbreak. Clinical Infectious Diseases 2022; 74(4):695–702.
37. Cote CK et al. Protection elicited by attenuated live *Yersinia pestis* vaccine strains against lethal infection with virulent *Y. pestis*. Vaccines 2021; 9(2):161. doi: 10.3390/vaccines9020161.
38. Hammerl J et al. Properties of two broad host range phages of *Yersinia enterocolitica* isolated from wild animals. International Journal of Molecular Sciences 2021; 22(21):11381. doi: 10.3390/ijms222111381.
39. Hess KL, Jewell CM. Phage display as a tool for vaccine and immunotherapy development. Bioengineering & Translational Medicine 2020; 5(1):e10142. doi: 10.1002/btm2.10142.
40. Jun JW et al. Bacteriophages reduce *Yersinia enterocolitica* contamination of food and kitchenware. International journal of food microbiology 2018; 271:33–47.
41. Moses S et al. Characterization of *Yersinia pestis* phage lytic activity in human whole blood for the selection of efficient therapeutic phages. Viruses 2021; 13(1):89. doi: 10.3390/v13010089.
42. Moses S et al. Reporter-phage-based detection and antibiotic susceptibility testing of *Yersinia pestis* for a rapid plague

- outbreak response. *Microorganisms* 2021; 9(6):1278. doi: 10.3390/microorganisms9061278.
43. Rosario-Acevedo R et al. Plague prevention and therapy: perspectives on current and future strategies. *Biomedicines* 2021; 9(10):1421. doi: 10.3390/biomedicines9101421.
44. Rosner B.M. et al. Clinical aspects and self-reported symptoms of sequelae of *Yersinia enterocolitica* infections in a population-based study, Germany 2009–2010. *BMC infectious diseases* 2013; 13(1):236. doi: 10.1186/1471-2334-13-236.
45. Salem M et al. T4-like bacteriophages isolated from pig stools infect *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* using LPS and OmpF as receptors. *Viruses* 2021; 13(2):296. doi: 10.3390/v13020296.
46. Saraka D et al. *Yersinia enterocolitica*, a neglected cause of human enteric infections in Cote d'Ivoire. *PLoS neglected tropical diseases* 2017; 11(1):e0005216. doi: 10.1371/journal.pntd.0005216.
47. Schwudke D et al. Broad-host-range *Yersinia phage* PY100: genome sequence, proteome analysis of virions, and DNA packaging strategy. *Journal of bacteriology* 2008; 190(1):332–342.
48. Singh AK, Curtiss III R, Sun W. A recombinant attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* vaccine delivering a *Y. pestis* YopENt138-LcrV fusion elicits broad protection against plague and yersiniosis in mice. *Infection and immunity* 2019; 87(10):e00296-19. doi: 10.1128/IAI.00296-19.
49. Skurnik M. Molecular genetics, biochemistry and biological role of *Yersinia lipopolysaccharide* / In: Skurnik M, Bengoechea JA, Granfors K (eds). *The Genus Yersinia. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 529. Springer, Boston, MA, 2004:187–197.
50. Tao P et al. A bacteriophage T4 nanoparticle-based dual vaccine against anthrax and plague. *MBio* 2018; 9(5):e01926-18. doi: 10.1128/mBio.01926-18.

RELEVANCE OF STUDYING YERSINIA BACTERIOPHAGES

A.O. ANOPRIENKO, N.E. GAEVSKAYA, M.P. POGOZHOVA, A.V. TYURINA

Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don

A review of historical and modern data on the phenomenon of bacteriophagy in the context of the study of yersiniosis is presented. Both of these problems are considered separately and in combination. The emphasis was on phage therapy and phage prophylaxis. Recently, researchers have begun to pay attention to phage diagnostics. The topic of plague bacteriophagy is analyzed in detail. It builds priorities, gives a historical aspect in relation to the dynamics of the interests of specialists in the study of this issue: including in terms of orienting the activities of specialists of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor to the study of both *Yersinia* bacteriophages and the problem of bacteriophage in general. The staff of the Institute isolated and characterized bacteriophages of different types of pathogenic bacteria. Currently, studies of *Yersinia* and other phages of especially dangerous infections are being continued in order to expand the depository collection of bacteriophages with known biological and molecular genetic properties.

Keywords: yersinia bacteriophages, general problems of bacteriophage, phages of especially dangerous infections.

Address:

Анопrienko А.О.
junior researcher lab. bacteriophages Rostov-on-Don
Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don
E-mail: nyra.anoprienko.1985@gmail.com

Для цитирования:

Анопrienko А.О., Гаевская Н.Е., Погожова М.П., Тюрина А.В. Актуальность изучения иерсиниозных бактериофагов. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2023; 19(1): 65–74.

For citation:

A.O. Anoprienko, N.E. Gaevskaya, M.P. Pogozhova, A.V. Tyurina. Relevance of studying yersinia bacteriophages. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2023; 19(1):65–74 (in Russian).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОДНОРАЗОВЫХ БИОРЕАКТОРНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ СУСПЕНЗИОННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

А.А. ДАНИЛОВА*, Н.С. ПИВОВАРОВА

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения РФ

Повышенная гибкость процесса и высокий оборот привели к внедрению одноразовых технологий в фармацевтической промышленности. Исследования показали, что использование одноразовых биореакторов может существенно повлиять на эффективность производственного процесса за счет снижения капитальных затрат, повышения гибкости производства, сокращения времени и затрат на запуск продукта с уменьшением риска перекрестного загрязнения. Разнообразие конфигураций биореакторов открывает возможности для проведения процесса со значительно более низкими скоростями сдвига, что уменьшает стрессовое воздействие на клеточные структуры.

Ключевые слова: биофармацевтическое производство, одноразовые биореакторы, одноразовые технологии, культуральные мешки, культивирование растительных клеток, суспензионные культуры, обзоры.

Введение

Растительное сырье в качестве источника ценных биологически активных веществ (БАВ) находит все большее применение в современной практике. Это связано с тем, что растения продуцируют активные соединения — вторичные метаболиты, которые обуславливают функционирование комплекса жизнеобеспечивающих свойств организма: размножения, защиты, симбиоза и т.д. [2, 45]. Благодаря сложной стереохимической структуре вторичные метаболиты обладают ценными фармакологическими свойствами, что делает их потенциальным объектом для исследований и разработок лекарственных средств (ЛС) в фармацевтической отрасли.

Однако использование интактных растений в технологии фитопрепаратов сопряжено с рядом трудностей. Продуцирование и накопление вторичных метаболитов растениями в необходимых количествах связано с ответной реакцией организма на действие различных стресс-факторов окружающей среды, которые постоянно меняются. Как правило, скорость биосинтеза активных молекул относительно низкая, поскольку требует значительных энергетических затрат с точки зрения метаболитического

цикла растительных клеток [13]. К тому же рост растений в естественной среде обитания часто ограничен ареалом распространения [24]. Для использования сырья в технологии фитопрепаратов необходим относительно продолжительный период времени (несколько лет), чтобы организм обладал достаточным метаболическим потенциалом.

Другая проблема заключается в использовании традиционных методов производства, предполагающих сбор и заготовку сырья в естественной среде обитания. Поскольку условия окружающей среды изменчивы, в процессе культивирования интактных растений могут возникать ситуации, требующие использования дополнительных средств (удобрений, пестицидов, гербицидов, стимуляторов роста), действие которых прямым образом влияет на количество и качество вторичных метаболитов [24, 27].

Для производственных предприятий объемы заготовок растительного материала варьируют в пределах нескольких тонн [6, 41]. Кроме того, операции по сбору образцов, установлению их пригодности, последующей сушке представляют собой сложный комплекс процедур в рамках надлежащих практик для обеспечения заявленных свойств готового продукта [6].

Внедрение технологий культивирования растений *in vitro*

Трудоемкость и длительность реализации классических подходов обусловили направленный поиск альтернативных методов получения сырья. Развитие биотехнологии способствовало использованию растительных

© 2023 г. Данилова А.А., Пивоварова Н.С.

* Автор для переписки:

Данилова Александра Артёмовна
инженер лаборатории аддитивных технологий, ассистент кафедры
промышленной технологии лекарственных препаратов ФГБОУ ВО
СПХФУ Минздрава России, Санкт-Петербург
E-mail: shmarova.aleksandra@pharminnotech.com

клеток как отдельных самостоятельных структур для направленного и контролируемого синтеза вторичных метаболитов. Это связано со специфическими свойствами клеток — тотипотентностью и пластичностью. Под действием различных сигналов (стрессовых факторов) клетки способны изменять программу своего развития и фенотипические характеристики, поскольку процессы клеточной дифференциации обратимы (свойство пластичности) [34]. Вместе с тем клетки могут дедифференцироваться и вступать на эмбриональный путь развития [8]. Другими словами, отдельная структура в виде клетки способна дать начало целому организму путем соматического эмбриогенеза без необходимости оплодотворения, поскольку содержит набор генетической информации, как у интактного растения (свойство тотипотентности) [42].

Преимущества технологии культивирования заключаются в относительно быстрой наработке биомассы (выраженная кинетика роста клеток), независимости от влияния внешних факторов (климатических, экологических, географических) и в отсутствии опасности контаминации вирусами и прионами животного происхождения [1, 47].

Благодаря развитию инновационных подходов биотехнологии появляются предпосылки для создания биофабрик на основе культур клеток растений [1] с целью производства различных соединений, включая вторичные метаболиты [4, 39] и рекомбинантные белки [35].

В настоящее время для получения биофармацевтической продукции растительного происхождения используются различные подходы и методы: создание калусных и суспензионных культур, культур иммобилизованных клеток, эмбрионов, «бородатых» корней [28, 29]. В рамках данного обзора рассмотрено суспензионное культивирование растительных клеток.

Выращивание растительных клеток на жидкой питательной среде отличается относительно быстрыми темпами роста (по сравнению с калусными культурами), а также снижением риска контаминации биомассы различными микроорганизмами, продуктами метаболизма грибов (микотоксинами) и пестицидами [15]. Суспензионная культура является удобным объектом для культивирования в биореакторных системах [21, 28]. Появляются широкие возможности получения гораздо большего и необходимого количества клеток благодаря величине соотношения площади поверхности и объема аппарата, удобства масштабирования, повышенной автоматизации и контроля процесса [3].

При разработке технологии лекарственных препаратов (ЛП) на основе вторичных метаболитов, по-

лученных из биомассы клеточной культуры растения, необходимо учитывать требования надлежащей производственной практики: безопасность, эффективность и качество [5, 26, 48]. По этой причине внедрение биореакторов как герметичных и изолированных систем со сниженным риском контаминации продукта становится прогрессивным решением.

Масштабирование культивирования: промышленные биореакторы

В последнее десятилетие активно изучаются аспекты применения биореакторов для наработки биомассы в условиях промышленного производства. Основной задачей для перехода к более совершенным биореакторным системам является масштабирование технологии выращивания культур растительных клеток (рис. 1).

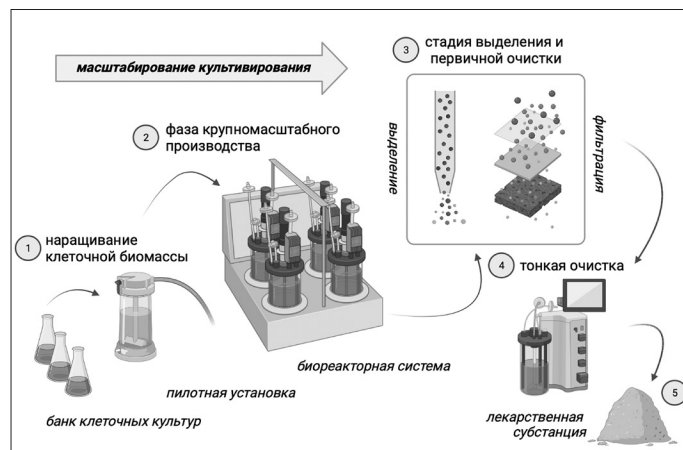


Рис. 1. Процесс масштабирования технологии суспензионного культивирования растительных клеток

В общем случае преимуществами биореакторных систем являются:

- возможность масштабирования производства БАВ на основе суспензионных культур в условиях *in vitro*;
- сокращение количества рутинных процедур обработки (экономия энергетических и временных ресурсов);
- возможность регулирования и манипулирования условиями микросреды в аппарате на разных стадиях работы;
- простота использования, например, при инокуляции или отборе проб;
- создание погруженной культуры для улучшения пролиферации клеток и поглощения питательных компонентов (для увеличения выхода по БАВ) [33].

Использование биореакторов для культивирования клеток растений позволяет сохранить стерильность и защищенность культуры.

Основу ранних попыток крупномасштабного культивирования составляли бактериальные ферментеры

с системой аэрации [43]. Однако недостатком конструкции стала малая скорость подачи воздуха для перемешивания больших объемов суспензии растительных клеток. Вследствие этого возникла необходимость внедрения механических систем перемешивания, например, импеллеров (перемешивающих устройств). В дальнейшем были предложены технологии производства биомассы растительных клеток, основанные на многофазовых биореакторных системах из стекла или нержавеющей стали по принципу культивирования клеток млекопитающих [44]. Такие системы являются дорогостоящими с точки зрения настройки и обслуживания. Некоторые биореакторы представляют собой многокомпонентную конструкцию с воздушным лифтом, предназначенную для обеспечения перемешивания и насыщения среды кислородом или инертным газом путем его подачи через барботер [14]. В данном случае недостатком является давление газа, размер пузырьков и создание нежелательных сдвиговых сил в среде, что создает необходимость использования сложных технологий аэрации.

В современной практике производство вторичных метаболитов в промышленных масштабах достигнуто только для нескольких видов лекарственных растений. Например, воробейник краснокорневой (*Lithospermum erythrorhizon*) используется для производства шиконина, различные виды тиса, в частности, тис китайский (*Taxus chinensis*) — для производства паклитаксела, женьшень обыкновенный (*Panax ginseng*) — для производства гинзенозидов, барбарис индийский (*Berberis aristate*) — для производства берберина [20, 33]. Ограниченность промышленного культивирования связана не только со специфическими особенностями растительных клеток, но и с недостатками биореакторных систем, изготовленных из нержавеющей стали. Среди лимитирующих параметров стальных биореакторов можно выделить:

- возможное повреждение клеток и изменение критических свойств целевого продукта из-за создания напряжения сдвига от перемешивающего устройства в процессе культивирования;
- высокую стоимость эксплуатации и обслуживания биореакторных систем;
- относительно большие габариты;
- трудоемкость очистки и необходимость внедрения систем СІР-мойки;
- необходимость проведения периодической стерилизации аппаратов;
- трудоемкость последующего отделения носителей (культурального бульона) от остатков биомассы [7].

Необходимость оптимизации процесса, а также увеличение интереса к выращиванию культур растительных клеток способствовали разработке однофазовых биореакторных систем (ОБС) [10].

Однофазовые биореакторные системы: достоинства и недостатки

Внедрение так называемых «однофазовых технологий» в биофармацевтике в последние годы становится незаменимым элементом высокотехнологичного производства. Данная тенденция — логическое следствие основных преимуществ однофазовых биореакторов: компактности, снижения уровня загрязнения (перекрестной контаминации), экономии денежных ресурсов (снижение капитальных затрат), уменьшения количества отходов и воздействия на окружающую среду [32, 38]. Возможность предварительной стерилизации обуславливает более быстрое введение аппаратов в эксплуатацию, то есть отпадает необходимость в трудоемкой и дорогостоящей очистке и тепловой стерилизации [17, 32, 36]. Кроме того, сокращается время наладки оборудования, а изменения в технологическом процессе могут быть более легко адаптированы (особое преимущество при производстве нескольких продуктов), когда ни очистка, ни стерилизация не требуются [17, 32, 38]. Аналогичным образом уменьшается вероятность перекрестного загрязнения продукта и микробной контаминации, требования к валидации и документации в процессе производства снижаются [17, 36]. Дополнительные преимущества однофазовых материалов заключаются в экономии времени (например, времени разработки, изготовления и выхода на рынок) и уменьшении площади объекта. Можно сделать вывод, что однофазовые материалы обладают выраженными преимуществами по сравнению с многофазовыми аналогами при правильном выборе и использовании.

Применение однофазовых биореакторов позволяет обеспечить быстрое внедрение в производство продукции в соответствии с GMP, а также ускорить процесс адаптации между партиями. В настоящее время используются однофазовые биореакторы объемом от 1000 до 2000 литров. Производственные мощности крупных биореакторов способствуют изготовлению большего количества ЛС, а также позволяет создать стартовый запас активных субстанций [18].

Среди ключевых аспектов, которые определяют эффективность работы однофазового биореактора, можно выделить следующие: герметичность, стерильность, оптическую прозрачность корпуса, простоту обслуживания, возможность контроля параметров микросреды

(температура, рН, концентрация растворенного кислорода), легкую управляемость, высокую пропускную способность, отсутствие воздушных пузырьков при перемешивании культуральной среды, экономичность [10, 17, 32, 36, 38].

Несмотря на ряд потенциальных преимуществ, внедрение ОБС на промышленном уровне лимитировано в виду сложности подбора материала культурального мешка и надежных одноразовых онлайн-датчиков [18, 32, 38]. По-прежнему существуют ограничения на использование полимерных материалов из-за химических, биологических и физических свойств пластика [17, 32, 38]. Одним из рисков, связанных с использованием ОБС, является миграция нежелательных компонентов из пластикового материала в объем культуральной жидкости. Такие компоненты могут быть выщелачиваемыми (миграция в условиях процесса с течением времени) и экстрагируемыми (миграция под воздействием агрессивных условий процесса, например, высоких температур). Дополнительными проблемами, которые ограничивают использование ОБС, являются лимитированная масштабируемость (из-за механической прочности материала), а также отсутствие передовых методов автоматизации [10]. Другим недостатком одноразовых систем становится зависимость от поставщиков, возникающая в результате отсутствия процедур стандартизации оборудования. Немаловажную проблему создает упаковка ОБС, которая должна обеспечивать целостность системы на уровне поставщика, а также при производстве и поддержании стерильности.

Несмотря на ряд приведенных недостатков, внедрение ОБС на биофармацевтических производствах востребовано. В настоящее время одноразовые технологии совершенствуются в соответствии с производственными мощностями и научно-техническими исследованиями.

История разработки одноразовых биореакторов

Впервые одноразовые пластиковые биореакторы были использованы для выращивания растительных культур в 1995 году. Израильская компания Osmotek запатентовала биореактор Life Reactor с пузырьковой колонной, в котором аэратор (барботер) встраивается в пластиковый мешок конической формы (рабочий объем от 1,5 до 5 л) [16]. Данная ОБС изготовлена из светопропускающей пластиковой пленки с портом для инокуляции биомассы и отбора проб. Для перемешивания и аэрации культурального бульона через барботер осуществляется подача стерильного воздуха.

Первым масштабируемым одноразовым биореактором стал WAVE BIOREACTOR 20, который представляет собой мешочный аппарат с волновым перемешиванием в одномерной плоскости (1D-перемешиванием) [40]. Биореактор состоит из предварительно стерилизованной гибкой пластиковой камеры, которая частично заполняется питательной средой с инокулятом (рис. 2). Оставшаяся часть мешка заполнена воздухом. Во время культивирования воздух непрерывно пропускается через воздушное пространство камеры. Перемешивание и массоперенос достигаются путем раскачивания культурального мешка из стороны в сторону. Это качательное движение создает волны на границе раздела фаз «жидкость-воздух», что значительно улучшает кислородную циркуляцию [10, 40].

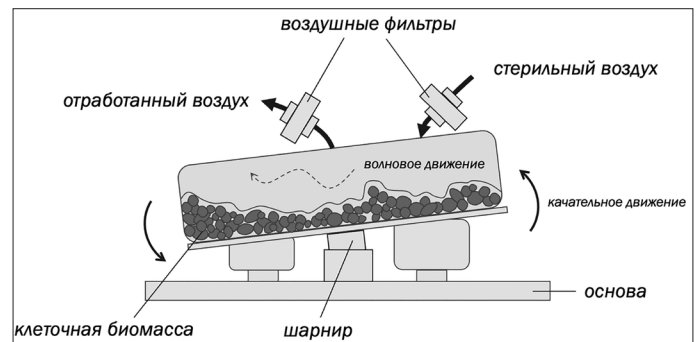


Рис. 2. Устройство одноразового биореактора WAVE BIOREACTOR 20

Непрерывный поток воздуха обеспечивает насыщение кислородом и газообмен для контроля рН и удаления углекислого газа. Выходящий воздух проходит через стерилизующий фильтр и обратный клапан, который обеспечивает полную загрузку камеры. Клапан также предотвращает чрезмерное заполнение и возможный разрыв мешка. Решением проблемы мониторинга процесса становится возможность размещения всего устройства внутри обычного CO₂-инкубатора для клеточных культур с целью контроля температуры и рН [40].

Начиная с 2000-х годов одноразовые биореакторы с волновым перемешиванием успешно используются для выращивания суспензионных и корневых культур растений в контексте технологических разработок как в лабораторных, так и в производственных масштабах.

Сегодня известны примеры успешного применения одноразовых биореакторов для выращивания растительных клеток в рамках производственной практики. В частности, израильской компанией Protalix biopharmaceutics предложена технология ProCellEx, предполагающая культивирование генетически модифицированных кор-

невых клеток моркови в полиэтиленовых биореакторах для получения рекомбинантной активной формы лизосомального фермента человека — β -D-глюкозил-N-ацилсфингозин глюкогидролазы (Талиглюцеразы альфа) [30, 47]. ЛП был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) еще в 2012 году и до сих пор является востребованным на мировом фармацевтическом рынке. Создание платформы на основе растительных клеток для получения рекомбинантных белков дало возможность нивелировать часть проблем, возникающих при стандартном подходе к получению белков из клеток млекопитающих. Использование биореакторной платформы ProCellEx® предполагает более быструю наработку биоматериала для проведения доклинических и клинических испытаний [47]. Это приводит к снижению капитальных затрат на создание и обслуживание производственных установок и систем.

Интересным примером является технология PhytoCellTec™ получения экстракта на основе суспензионной культуры клеток яблони домашней (*Malus domestica*) компанией Mibelle Biochemistry, Швейцария [37]. Изначально клетки культивируют в конических колбах в условиях постоянного перемешивания. После этого полученный инокулят переносят в 50-литровые полимерные мешки, закрепленные на качающихся платформах, которые представляют собой одноразовые биореакторы. Для облегчения инокуляции и отбора проб в биореакторах с волновым одномерным перемешиванием имеются специальные завинчивающиеся крышки-порты [11]. Энергия перемешивания генерируется за счет качательного движения платформы биореактора, которое создает волновой поток в неподвижном мешке, содержащем клетки и питательную среду. Таким образом, перемешивание происходит с однородным рассеиванием энергии и более равномерным напряжением сдвига по сравнению с биореакторами с механическим перемешиванием. За счет постоянного обновления поверхности среды происходит поверхностная аэрация без пузырьков, что в конечном итоге приводит к меньшему пенообразованию и упрощает последующую обработку [37]. Для производства жидкого экстракта осуществляется забор биомассы с последующей сушкой и гомогенизацией под высоким давлением.

Устройство и принципы работы одноразовых биореакторов

В общем случае одноразовые биореакторы предназначены для создания закрытых систем с изолированным реакционным объемом, в контролируемых условиях которого организм-производитель (растительные клетки)

синтезирует целевой продукт в виде вторичных метаболитов или рекомбинантных белков [19, 23].

ОБС представляет собой трехкомпонентную систему, состоящую из жидкости, газа и клеток (твердой фазы). Вместе с периферийными элементами (например, инкубатором, шейкером, блоком измерения и управления) одноразовый биореактор должен обеспечивать герметичную замкнутую систему с устойчивыми условиями для роста клеток и выделения продукта. Основная функция биореакторной системы заключается в обеспечении оптимальных условий для физиологического и метаболического развития клеток путем непрерывного мониторинга ключевых параметров процесса и контроля условий культивирования.

Материалом корпуса контейнеров служат биосовместимые синтетические полимеры (например, полиэтилен, полистирол, политетрафторэтилен, полипропилен и этиленацетат) [10]. Как правило, культуральные мешки изготавливаются из многослойных пленок, состав которых представлен контактным, газо-/паробарьерным, внешним и связующим слоем (рис. 3).

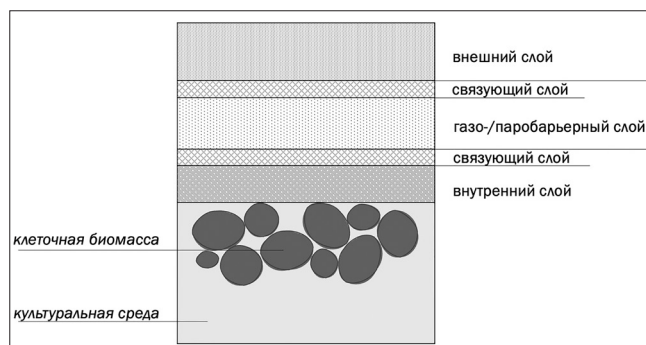


Рис. 3. Схематическое изображение структуры многослойных пленочных материалов одноразовых культуральных мешков

Преимущества полимеров заключаются в возможности предварительной стерилизации и последующей утилизации, что минимизирует затраты на очистку и дополнительную стерилизацию корпуса во избежание риска контаминации [10, 12, 32].

Одноразовые материалы могут быть жесткими (формованные системы) или гибкими (пакеты, изготовленные из многослойных пленок). Зачастую они поставляются предварительно стерилизованными, подвергнутыми либо гамма-облучению в дозах от 25 до 50 кГр, либо автоклавированию или стерилизации инертными газами [10]. Это устраняет необходимость в последующей стерилизации оборудования на этапе установки и монтажа, в отличие от аппаратуры из нержавеющей стали. Таким образом, одноразовые материалы могут

быть быстро введены в эксплуатацию. По завершении технологических операций использованные полимеры обеззараживаются и утилизируются. Таким образом, не требуются трудоемкие и дорогостоящие процедуры очистки, для реализации которых необходимо использование коррозионных химикатов и воды для инъекций.

При разработке конфигурации ОБС необходимо оценивать параметры суспензионной культуры растительных клеток. В общем случае рост суспензионных культур характеризуется увеличением концентрации и агрегации, что приводит к пропорциональному росту уровня вязкости и, в большинстве случаев, — ньютоновскому поведению культурального бульона [46]. Перечисленные эффекты обусловлены морфологией растительных клеток (рис. 4).

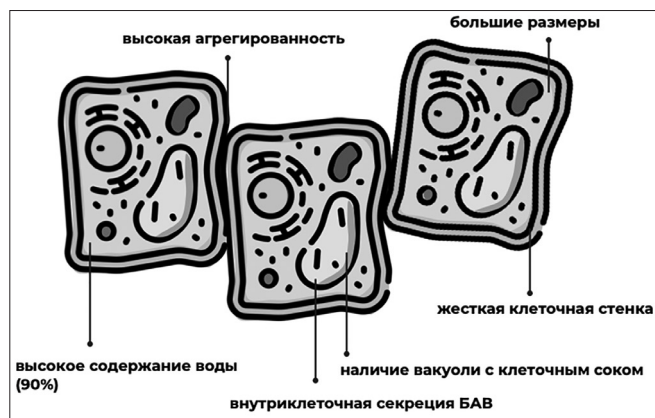


Рис. 4. Морфологические и физиологические особенности растительных клеток

Изменение вязкости культурального бульона связано также с выделением в среду полисахаридов и других метаболитов. В свою очередь, на поздних стадиях цикла культивирования (в стационарной фазе и фазе деградации) вязкость среды связана с поглощением воды растительными клетками из-за увеличения размера структур и уменьшения воды в клеточной суспензии. Как правило, увеличение вязкости культурального бульона провоцирует снижение потребляемой мощности биореактора при тех же рабочих параметрах, что приводит к последующему уменьшению эффективности перемешивания и массопереноса кислорода с ограничением роста культуры [10, 36].

Для снижения лимитов массопереноса и напряжения сдвига, приводящих к спаду ростовой активности клеток и уменьшению выхода вторичных метаболитов, необходимы исследования отличительных особенностей различных конструкций биореакторов: типа потока, профиля усиления сдвига, эффективности перемешивания и переноса кислорода.

Конструкционные особенности ОБС определяются взаимосвязью биосинтеза целевого соединения с ростовым циклом клеток, а также локализацией источника накопления вторичного метаболита (внутри клетки или с использованием внешних механизмов) [17, 18, 32, 36, 38]. В случае, если соединение продуцируется во время экспоненциальной фазы роста, требуется только один реактор для наработки биомассы и извлечения целевого соединения. Однако, когда БАВ синтезируется после завершения ростовой фазы, необходимо внедрение комплексной системы, состоящей из нескольких единиц оборудования [10]. При таком подходе один реактор может использоваться в течение экспоненциальной фазы для увеличения прироста биомассы клеток, а другой — для производства метаболита на стационарной фазе цикла [12, 19].

При накоплении вторичных метаболитов внутри клетки биореактор работает в периодическом режиме (с возможностью подпитки) для того, чтобы клетки можно было «пермеабелизировать» (изменить проницаемость клеточной мембраны) с целью высвобождения целевого компонента по завершении работы. Использование непрерывного режима работы биореактора характерно в том случае, когда вторичные метаболиты секретируются в культуральную среду, что позволяет извлекать интересные соединения по мере их синтеза [19, 23].

Классификация конструкций одноразовых биореакторов

Современные конструкционные решения для ОБС разнообразны. Для того чтобы избежать ограничений массопереноса и гарантировать оптимальный рост клеток и экспрессию продуктов, культуральные мешки обычно имеют механический, гидравлический или пневматический привод. В настоящее время предложена классификация ОБС по механизму передачи энергии и принципу их работы (рис. 5).

Однако не все типы ОБС применимы для суспензионных культур растительных клеток. К настоящему времени известно, что биореакторы с системой распыления неэффективны для суспензионных форм и используются преимущественно для выращивания культур «бородатых» корней, например, для базилика душистого (*Ocimum basilicum*) и женьшеня обыкновенного (*Panax ginseng*). Для растительных клеток, выращиваемых на жидкой питательной среде, наиболее оптимальными конструкциями являются одноразовые биореакторы с механическим и пневматическим приводом за счет создания перемешивания культуральной среды и предотвращения чрезмерного формирования агломератов [23].



Рис. 5. Классификация одноразовых биореакторов по механизму передачи энергии

Таблица 1

Применение различных типов ОБС для суспензионного культивирования [10, 23, 25]

Тип ОБС	Допустимые объемы, л	Растительная культура	Продукт и применение
С перемешивающим устройством (вращающийся импеллер)	2 – 25*	Лещина обыкновенная или лесной орех (<i>Corylus avellana</i>), соя культурная (<i>Glycine max</i>), ячмень обыкновенный (<i>Hordeum vulgare</i>), яблоня домашняя (<i>Malus domestica</i>), табак обыкновенный (<i>Nicotiana tabacum</i>), виноград культурный (<i>Vitis vinifera</i>)	Вторичные метаболиты для фармацевтической промышленности, антитела
С перемешивающим устройством (качающийся импеллер)	10*		Вторичные метаболиты для фармацевтической промышленности
Вибрационные (с вибрационной платформой)	1 – 100*		Вторичные метаболиты для фармацевтической и косметической промышленности, рекомбинантные белки
Вибрационные (с вибрационными дисками)	100*	Яблоня домашняя (<i>Malus domestica</i>)	Вторичные метаболиты для косметической промышленности
Орбитальные	1 – 100*	Подсолнечник однолетний (<i>Helianthus annuus</i>), лещина обыкновенная (<i>Corylus avellana</i>), табак обыкновенный (<i>Nicotiana tabacum</i>), виноград культурный (<i>Vitis vinifera</i>)	Вторичные метаболиты для фармацевтической, косметической и пищевой промышленности, антитела
Пузырьковая колонна	1,5 – 400	Белена египетская (<i>Hyoscyamus muticus</i>), соя культурная (<i>Glycine max</i>), табак обыкновенный (<i>Nicotiana tabacum</i>), рис посевной (<i>Oryza sativa</i>)	Вторичные метаболиты для фармацевтической и пищевой промышленности, рекомбинантные белки

Примечание: * – объем наполнения

**Классификация одноразовых биореакторов для суспензионного культивирования растительных клеток
[10, 23, 25, 32]**

№ п/п	Тип устройства	Конструкционная особенность	Примеры
ОБС с механическим приводом			
1.1	С перемешивающим устройством	Одноразовый биореактор, представляющий собой пластичную емкость для культивирования CultiBag STR (объем заполнения 50–1000 л), закрепленную в опорном каркасе из нержавеющей стали.	BIOSTAT CultiBag STR, Sartorius Stedim, Германия
		Объемный полимерный контейнер с встроенной пластиковой мешалкой и возможностью оснащения светодиодными лампами (LED, белый, синий и красный свет)	Applikon AppliFlex ST, Geringe AB, Швеция
1.2		Одноразовый мешок S.U.B. (объемом 0,05–2 м ³) оснащен угловой мешалкой (мешалка с лопастями, смещенными от центра) и аэратором, который в зависимости от требований заказчика может быть исполнен в двух вариантах: микро- и кольцевом.	Single Use Bioreactor (SUB), Thermo Fisher Scientific, США
1.3		Жесткий одноразовый сосуд, в котором установлены двухступенчатые сегментные лопастные мешалки, L-образный макроаэратор (распылитель) и встроенный датчик.	UniVessel SU Bioreactor, Sartorius Stedim, Германия
1.4		Одноразовый мешок кубовидной формы с лопастной мешалкой, которая совершает эллиптическое вращательное движение. Дополнительными встроенными устройствами культурального контейнера являются микроаэратор, закрепленный на перемешивающем устройстве.	Nucleo Bioreactor, ATMI® LifeSciences, Бельгия
1.5 Вибрационные			
1.5.1	- с вибрационной платформой (волновое перемешивание)	Одноразовые полимерные мешки, закрепленные на качающейся платформе (шейкере) горизонтально.	BIOSTAT CultiBag RM, Sartorius Stedim, Германия
1.5.2		Одноразовый, предварительно стерилизованный мешок, помещенный на качающееся основание. Платформа включает в себя системы в виде самого биореактора, WAVE Mixer™, герметизаторов и предохранителей трубок, полволоконных и проточных фильтров, хроматографической системы АКТА™ с одноразовым проточным контуром.	WAVE bioreactor, GE Healthcare, США
1.5.3	- с вибрационными дисками	Одноразовый мешок (объем заполнения 2–500 л) с нагревательной рубашкой, встроенной в контейнер из нержавеющей стали. Мешок содержит вертикальный полый вал, на котором закреплены один или несколько конических перфорированных дисков. Благодаря этому создается осевое вращение потока среды в мешке для перемешивания и аэрации. Конические отверстия диска уменьшают образование вихрей, вызывают восходящий и нисходящий потоки, влияют на перемешивание и подачу кислорода в мешок.	Vibromix (Saltus) bioreactor, Meissner Filtration Inc., США
1.6	Орбитальные	Жесткая полимерная колба для встряхивания с поверхностной аэрацией (ОБС для лабораторных и пилотных исследований)	SENSOLUX Erlenmeyer flask, Sartorius Stedim, Германия
ОБС с пневматическим приводом			
2.1	С пузырьковой колонной	Цилиндрический сосуд объемом заполнения 10–150 л с расположенным в нижней части электромагнитным клапаном, который генерирует подачу воздуха с образованием вытянутых пузырьков («slug bubbles»)	Slug Bubble Bioreactor (SBB), Nestlé, Швейцария
2.2		Одноразовый мешок CellexusBag, закрепленный в пластиковом держателе. Материал контейнера для культивирования — полиэтилен низкой плотности	CellMaker Regular, Cellexus, Великобритания

На современном рынке коммерчески доступными являются два класса ОБС: с механическим и пневматическим приводом (табл. 1 и 2). По частоте и широте использования доминируют мешочные биореакторы с механическим приводом [10, 19]. В частности, существуют аппараты, в которых потребляемая мощность для массо- и теплообмена контролируется внутренними (мешалка) или внешними (подвижная платформа) механическими устройствами. Иначе говоря, в первом случае перемешивание осуществляется за счет вращения мешалки (импеллера), а во втором — за счет колебательных, вращательных или поступательных движений осциллирующих устройств (платформ-шейкеров, вибрационных дисков). Для ОБС с вращающимися мешалками используется механическое соединение с валом (простым уплотнением) или магнитное соединение. В случае вращающихся и вибрирующих валов вал непосредственно приваривается к одноразовому культуральному мешку. Наиболее часто используются магнитные мешалки, которые обеспечивают высокую стерильность и безопасность продукта благодаря закрытой конструкции. Однако частицы износа, образующиеся на поверхностях скольжения, могут загрязнять смесь. Для нивелирования потенциального недостатка магнитных мешалок предложены так называемые «левитирующие мешалки» [25]. Образование частиц полностью исключается благодаря движению мешалки без трения.

В случае ОБС с осциллирующими устройствами в зависимости от интенсивности принципа механической работы жидкая фаза, находящаяся внутри культурального мешка, подвергается покачиванию, пульсации или всплеску, в результате чего происходит волновое перемешивание среды [22]. Основным элементом конструкции таких аппаратов является полимерный мешок, закрепленный на платформе. Колебательные движения, передаваемые от платформы к мешку, способствуют перемешиванию и переносу кислорода без образования пузырьков. Генерация и распространение волновых колебаний внутри мешка влияет на поток культуральной жидкости, время перемешивания, скорость массопереноса кислорода, напряжение сдвига, что в конечном счете приводит к росту клеток и наработке биомассы. Существующие в настоящее время биореакторы с волновым перемешиванием в основном отличаются по пространственному направлению колебательных движений (одно-, двух- или трехмерные) [10, 23].

Изначально для культивирования растительных клеток в виде суспензий использовались одноразовые биореакторы с одномерными волновыми колебаниями (например, Cultibag RM, Wave Bioreactor, AppliFlex,

WUB) [10, 17, 23, 25, 36, 38]. В отличие от моделей других производителей, биореактор WUB не имеет качающегося блока. Колебательное движение вызывается периодическим подъемом гибкой головной и/или ножной части горизонтальной платформы, на которой находится мешок (объем заполнения 20–250 л). Последующее поступательное движение возникает в результате опускания платформы [23].

Коммерческий сегмент рынка ОБС представлен платформами, оснащенными волновыми смесителями культуральных мешков от следующих производителей: GE Healthcare (США) — ReadyToProcess WAVE™ (предыдущее название бренда: WAVE), и Sartorius AG, Германия — BIOSTAT® RM (предыдущее название бренда: BioWave). Существенным преимуществом упомянутых ОБС является полная масштабируемость в диапазоне объема культуры от 0,1 до 100 л (до 500 л в случае системы WAVE™). В настоящее время данные волноиндуцируемые системы занимают доминирующую долю рынка по сравнению с другими прототипированными устройствами [9, 23, 25].

Также известны биореакторы (пузырьковые колонны) с пневматическим приводом, в которых массо- и теплообмен достигается только за счет прямого нагнетания воздуха или газа [23, 25]. Известным примером ОБС пневматического типа для суспензионных культур является Slug Bubble Bioreactor (SBB). В исследованиях по суспензионному культивированию клеток табака BY-2, выращенных в SBB, было достигнуто увеличение времени удвоения от 38,4 до 60 ч и пиковой концентрации биомассы от 12,3 до 17,8 г сухого веса [9]. Кроме того, рост клеток и наработка изофлавона были более эффективными в SBB по сравнению с многоходовыми биореакторами с перемешиванием, что объясняется снижением напряжения сдвига в пузырьковом биореакторе [9, 25]. Успешное внедрение SBB отмечено в исследованиях Квона с коллегами при наработке биомассы риса для продуцирования рекомбинантного цитотоксического Т-лимфоцитарного антигена 4-иммуноглобулина (hCTLA4Ig) [9, 22, 23, 25, 31].

Интересно отметить, что пузырьковые колонны в виде полимерного мешка в настоящее время являются самыми большими действующими одноразовыми биореакторами для растительных клеток. Они созданы на основе упомянутой ранее конструкции Life Reactor и используются для производства рекомбинантных белков (талиглуцеразы альфа, альфа-галактозидазы, альфа-1-антитрипсина, белка слияния фактора некроза опухолей) [21, 35, 43]. Основным достоинством является более

простая конструкция (неподвижные детали, отсутствие уплотнения вала). В результате подачи воздуха пузырьки поднимаются вверх по периферии сосуда и вызывают перемешивание и циркуляцию в культуральной среде [23].

Заключение

По мере развития биофармацевтической промышленности тенденция к повышению производительности, сокращению времени наработки технологии и увеличению дохода стимулирует замену традиционного оборудования из нержавеющей стали на ОБС. Повышенная гибкость процесса и высокий оборот привели к внедрению одноразовых технологий в фармацевтической промышленности. Платформы для биопроизводства в последние годы становятся более универсальными, сохраняя при этом высокую производительность и минимальное время простоя [22, 25]. В течение последнего десятилетия было коммерциализировано несколько типовых конструкций одноразовых биореакторов [10]. Исследования показали, что использование одноразовых биореакторов может существенно повлиять на эффективность производственного процесса за счет снижения капитальных затрат, повышения гибкости производства, сокращения времени и затрат на запуск продукта с уменьшением риска перекрестного загрязнения [10, 28, 32, 33]. Кроме того, одноразовые технологии позволяют сократить количество жидких отходов производственного процесса, снизить трудозатраты и уменьшить требования к качеству и валидации на месте [10, 32, 38]. Поэтому использование ОБС для выращивания суспензионных культур растительных клеток является перспективным и имеет тенденцию для полномасштабного развития в ближайшем будущем.

Разнообразие конфигураций биореакторов дает возможность для проведения процесса со значительно более низкими скоростями сдвига, что уменьшает стрессовое воздействие на клеточные структуры. В связи с этим открывается перспектива для параллельной разработки и исследования процессов в целом.

Литература

1. Орлова А.А., Стругар Й., Штарк О.Ю., Жуков В.А., Лужанин В.Г., Пovyдыш М.Н. Использование подходов метаболомики в анализе лекарственных растений и фитопрепаратов (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. — 2021. — Т. 10. — № 1. — С. 97–105.

2. Стрелкова М.А., Кириллова Н.В., Слепян Л.И. Компонентный состав и биологическая активность культивируемых клеток *Jucca gloriosa* (Agavaceae) // Химия растительного сырья. — 2014. — № 2. — С. 181–187.
3. Abraham E. et al. Bioreactor for scale-up: process control / In: Mesenchymal Stromal Cells. — Academic Press, Ch. 6, 2017. — P. 139–178. doi: 10.1016/B978-0-12-802826-1.00006-4.
4. Arya S.S. et al. Next-generation metabolic engineering approaches towards development of plant cell suspension cultures as specialized metabolite producing biofactories // Biotechnol. Adv. — 2020. — Vol. 45. — Art. 107635. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107635.
5. Cardoso J.C. et al. Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants // Horticultura Brasileira. — 2019. — Vol. 37. — P. 124–132.
6. Chen S.L. et al. Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects // Chin. Med. — 2016. — Vol. 11. — Art. 37. doi: 10.1186/s13020-016-0108-7.
7. Corbin J.M. et al. Technoeconomic analysis of semicontinuous bioreactor production of biopharmaceuticals in transgenic rice cell suspension cultures // Biotechnology and Bioengineering. — 2022. — Vol. 117. — No. 10. — P. 3053–3065.
8. Duarte-Aké F. et al. Somatic embryogenesis: polycomb complexes control cell-to-embryo transition / In: Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications. — Springer, Cham., 2019. — P. 339–354. doi: 10.1007/978-3-030-14760-0_13.
9. Ducos J.P. et al. Disposable bioreactors for plant micropropagation and mass plant cell culture // In: Eibl R., Eibl D. (eds). Disposable Bioreactors. Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology. — Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. — Vol. 115. — P. 89–115. doi: 10.1007/10_2008_28.
10. Eibl R. & Eibl D. Single-use equipment in biopharmaceutical manufacture / In: Single-use technology in biopharmaceutical manufacture. — John Wiley & Sons, 2019. doi: 10.1002/9781119477891.ch1.
11. Eibl R. et al. Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology // Applied Microbiology and Biotechnology. — 2010. — Vol. 86. — No. 1. — P. 41–49.
12. Georgiev M.I. et al. Hosting the plant cells in vitro: recent trends in bioreactors // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2013. — Vol. 97. — P. 3787–3800.
13. Gorlenko C.L. et al. Plant secondary metabolites in the battle of drugs and drug-resistant bacteria: new heroes or worse clones of antibiotics? // Antibiotics. — 2020. — Vol. 9. — No. 4. — Art. 170. doi: 10.3390/antibiotics9040170.
14. Han J.E. et al. Brazzein protein production in transgenic carrot cells using air-lift bioreactor culture // Plant Biotechnology Reports. — 2019. — Vol. 16. — No. 2. — P. 161–171.

15. Jan R. *et al.* Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions // *Agronomy*. — 2021. — Vol. 11. — No. 5. — Art. 968. doi: 10.3390/agronomy11050968.
16. Jossen V. *et al.* Single-use bioreactors — an overview. Chapter 4 / In: *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*. — John Wiley & Sons, 2019. — P. 37–52. doi: 10.1002/9781119477891.ch4.
17. Jossen V. *et al.* Stirred bioreactors. Chapter 10 / In: Larroche C., Angeles Sanroman M., Du G., Ashok P. (eds). *Current developments in biotechnology and bioengineering*. — Elsevier, Amsterdam, 2017. — P. 179–215. doi: 10.1007/978-1-0716-0191-4_10.
18. Kelley B. Developing therapeutic monoclonal antibodies at pandemic pace // *Nat. Biotechnol.* — 2020. — Vol. 38. — P. 540–545.
19. Khojasteh A. *et al.* Powerful plant antioxidants: A new bio-sustainable approach to the production of rosmarinic acid // *Antioxidants*. — 2020. — Vol. 9. — Art. 1273. doi: 10.3390/antiox9121273.
20. Kim H.G. & Kim J.H. Elucidation of the mechanism and kinetics of ultrasonic extraction of paclitaxel from plant cell cultures of *Taxus chinensis* // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. — 2022. — Vol. 27. — No. 4. — P. 668–677.
21. Kong E.Y. *et al.* Cell suspension culture: A potential in vitro culture method for clonal propagation of coconut plantlets via somatic embryogenesis // *Industrial Crops and Products*. — 2020. — Vol. 147. — Art. 112125. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112125.
22. Kwon J.Y. *et al.* Bioreactor engineering using disposable technology for enhanced production of hCTLA4Ig in transgenic rice cell cultures // *Biotechnol. Bioeng.* — 2013. — Vol. 110. — P. 2412–2424.
23. Lehmann N. *et al.* Disposable bioreactors for cultivation of plant cell cultures / In: Paek K.Y., Murthy H., Zhong, J.J. (eds) *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology*. — Springer, Dordrecht, 2014. doi: 10.1007/978-94-017-9223-3_2.
24. Li Y. *et al.* The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants // *Plant Physiology and Biochemistry*. — 2020. — Vol. 148. — P. 80–89.
25. Löffelholz C. *et al.* Bioengineering parameters for single-use bioreactors: Overview and evaluation of suitable methods // *Chemie Ingenieur Technik*. — 2013. — Vol. 85. — No. 1–2. — P. 40–56.
26. Marchev A.S. *et al.* Green (cell) factories for advanced production of plant secondary metabolites // *Critical Reviews in Biotechnology*. — 2019. — Vol. 40. — No. 4. — P. 443–458.
27. Mojsov K. New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering / In: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. — ELSEVIER, Amsterdam, Netherlands, 2017. — P. 215–222. ISBN: 978-0-444-63505-1.
28. Motolinía-Alcántara E.A. *et al.* Engineering considerations to produce bioactive compounds from plant cell suspension culture in bioreactors // *Plants*. — 2021. — Vol. 10. — No. 12. — Art. 2762. doi: 10.3390/plants10122762.
29. Nayak S. *et al.* Biotechnological production of antistress compounds: Current status and future prospects / In: Malik, S. (eds.) *Exploring Plant Cells for the Production of Compounds of Interest*. — Springer, Cham., 2021. doi: 10.1007/978-3-030-58271-5_7.
30. Nosaki S. *et al.* Transient protein expression systems in plants and their applications // *Plant Biotechnology*. — 2021. — Vol. 38. — No. 3. — P. 297–304.
31. Pilarek M. *et al.* Impact of operating parameters on values of a volumetric mass transfer coefficient in a single-use bioreactor with wave-induced agitation // *Chemical Engineering Research and Design*. — 2018. — Vol. 136. — P. 1–10. doi: 10.1016/j.cherd.2018.04.012
32. Rader R.A., & Langer E.S. Upstream single-use bioprocessing systems future market trends and growth assessment // *Bioprocess Int.* — 2011. — Vol. 10. — P. 12–18. doi: 10.1007/s00253-013-4817-x.
33. Rohini M.R., & Rajasekharan P.E. Scale-up production of bioactive compounds using bioreactors / In: Belwal T., Georgiev M.I., Al-Khayri J.M. (eds). *Nutraceuticals Production from Plant Cell Factory*. — Springer, Singapore, 2022. doi: 10.1007/978-981-16-8858-4_3.
34. Roosa A.E. *et al.* Genetic basis of plasticity in plants // *Journal of Experimental Botany*. — 2019. — Vol. 70. — Iss. 3. — P. 739–745.
35. Rozov S.M., & Deineko E.V. Strategies for optimizing recombinant protein synthesis in plant cells: classical approaches and new directions // *Molecular Biology*. — 2019. — Vol. 53. — No. 2. — P. 157–175.
36. Schirmer C. *et al.* An overview of drive systems and sealing types in stirred bioreactors used in biotechnological processes // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2021. — Vol. 105. — P. 2225–2242.
37. Schirmer C. *et al.* Single-use technology for the production of cellular agricultural products: Where are we today? // *Chemie Ingenieur Technik*. — 2022. — Vol. 94. — No. 12. — P. 2018–2025.
38. Seegers C.L. *et al.* Production routes toward podophylotoxin. — University of Groningen. — 2021. doi: 10.33612/diss.168957811.
39. Shih P.M. Towards a sustainable bio-based economy: redirecting primary metabolism to new products with plant synthetic biology // *Plant Sci.* — 2018. — Vol. 273. — P. 84–91.
40. Singh V. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation // *Cytotechnology*. — 2019. — Vol. 30. — P. 149–158.
41. Sucholas J.O. *et al.* Wild collection of medicinal and aromatic plants (MAPs) in Poland for commercial purposes: a system reviewed // *Herba Polonica*. — 2021. — Vol. 67. — No. 3. — P. 1–18. doi: 10.2478/hepo-2021-0014.

42. Su Y.H. et al. Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming // *Journal of Integrative Plant Biology*. – 2021. – Vol. 63. – No. 1. – P. 228–243.
43. Tekoah Y. et al. Large-scale production of pharmaceutical proteins in plant cell culture – the Protalix experience // *Plant Biotechnology Journal*. – 2015. – Vol. 3. – P. 1199–1208.
44. Valdiani A. et al. Bioreactor-based advances in plant tissue and cell culture: challenges and prospects // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2019. – Vol. 39. – No. 1. – P. 20–34.
45. Verma P. et al. Bioreactor upscaling of different tissue of medicinal herbs for extraction of active phytochemicals: a step towards industrialization and enhanced production of phytochemicals in plant growth regulators / In: Aftab T., Hakeem K.R. (eds). *Plant Growth Regulators*. – Springer, Cham., 2021. – P. 455–481.
46. Wilson S.A., & Roberts S.C. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules // *Plant Biotechnol. J.* – 2012. – Vol. 10. – P. 249–268.
47. Zagorskaya A.A., & Deineko E.V. Plant-expression systems: A new stage in production of biopharmaceutical preparations // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2021. – Vol. 68. – No. 1. – P. 17–30.
48. Zhou X. et al. Current status and major challenges to the safety and efficacy presented by Chinese herbal medicine // *Medicines*. – 2019. – Vol. 6. – No. 1. – Art. 14. doi: 10.3390/medicines6010014.
7. Corbin JM et al. Technoeconomic analysis of semicontinuous bioreactor production of biopharmaceuticals in transgenic rice cell suspension cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 2022; 117(10):3053–3065.
8. Duarte-Aké F et al. Somatic embryogenesis: polycomb complexes control cell-to-embryo transition. In: *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications*. Springer, Cham, 2019: 339–354. doi: 10.1007/978-3-030-14760-0_13.
9. Ducos JP et al. Disposable bioreactors for plant micropropagation and mass plant cell culture. In: Eibl R, Eibl D (eds). *Disposable Bioreactors. Advances in Biochemical Engineering. Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. 115:89–115. doi: 10.1007/10_2008_28.
10. Eibl R & Eibl D. Single-use equipment in biopharmaceutical manufacture. In: *Single-use technology in biopharmaceutical manufacture*. – John Wiley & Sons, 2019. doi: 10.1002/9781119477891.ch1.
11. Eibl R et al. Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010; 86(1):41–49.
12. Georgiev MI et al. Hosting the plant cells in vitro: recent trends in bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97:3787–3800.
13. Gorlenko CL et al. Plant secondary metabolites in the battle of drugs and drug-resistant bacteria: new heroes or worse clones of antibiotics? *Antibiotics* 2020; 9(4):170. doi: 10.3390/antibiotics9040170.
14. Han JE et al. Brazzein protein production in transgenic carrot cells using air-lift bioreactor culture. *Plant Biotechnology Reports* 2019; 16(2):161–171.
15. Jan R et al. Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. *Agronomy* 2021; 11(5):968. doi: 10.3390/agronomy11050968.
16. Jossen V et al. Single-use bioreactors – an overview. Chapter 4. In: *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*. John Wiley & Sons, 2019: 37–52. doi: 10.1002/9781119477891.ch4.
17. Jossen V et al. Stirred bioreactors. Chapter 10. In: Larroche C, Angeles Sanroman M, Du G, Ashok P (eds). *Current developments in biotechnology and bioengineering*. Elsevier, Amsterdam, 2017: 179–215. doi: 10.1007/978-1-0716-0191-4_10.
18. Kelley B. Developing therapeutic monoclonal antibodies at pandemic pace. *Nat Biotechnol* 2020; 38:540–545.
19. Khojasteh A et al. Powerful plant antioxidants: A new biosustainable approach to the production of rosmarinic acid. *Antioxidants* 2020; 9:1273. doi: 10.3390/antiox9121273.
20. Kim HG & Kim JH. Elucidation of the mechanism and kinetics of ultrasonic extraction of paclitaxel from plant cell cultures

References

1. Orlova AA, Strugar Y, Shtark OYU, Zhukov VA, Luzhanin VG, Povydysh MN. Ispol'zovaniye podkhodov metabolomiki v analize lekarstvennykh rasteniy i fitopreparatov (obzor). *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* 2021; 10(1):97–105 (in Russian).
2. Strelkova MA, Kirillova NV, Slepyan LI. Komponentnyy sostav i biologicheskaya aktivnost' kul'tiviruyemykh kletok *Jucca gloriosa* (Agavaceae). *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* 2014(2):181–187 (in Russian).
3. Abraham E et al. Bioreactor for scale-up: process control. In: *Mesenchymal Stromal Cells*. Academic Press, Ch 6, 2017:139–178. doi: 10.1016/B978-0-12-802826-1.00006-4.
4. Arya SS et al. Next-generation metabolic engineering approaches towards development of plant cell suspension cultures as specialized metabolite producing biofactories. *Biotechnol Adv* 2020; 45:107635. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107635.
5. Cardoso JC et al. Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. *Horticultura Brasileira* 2019; 37:124–132.
6. Chen SL et al. Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chin Med* 2016; 11:37. doi: 10.1186/s13020-016-0108-7.

- of *Taxus chinensis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2022; 27(4):668–677.
21. Kong EY et al. Cell suspension culture: A potential in vitro culture method for clonal propagation of coconut plantlets via somatic embryogenesis. *Industrial Crops and Products* 2020; 147:112125. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112125.
 22. Kwon JY et al. Bioreactor engineering using disposable technology for enhanced production of hCTLA4Ig in transgenic rice cell cultures. *Biotechnol. Bioeng* 2013; 110:2412–2424.
 23. Lehmann N et al. Disposable bioreactors for cultivation of plant cell cultures. In: Paek KY, Murthy H, Zhong, JJ. (eds) *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology*. Springer, Dordrecht, 2014. doi: 10.1007/978-94-017-9223-3_2.
 24. Li Y et al. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 2020; 148:80–89.
 25. Löffelholz C. et al. Bioengineering parameters for single-use bioreactors: Overview and evaluation of suitable methods. *Chemie Ingenieur Technik* 2013; 85(1–2):40–56.
 26. Marchev AS et al. Green (cell) factories for advanced production of plant secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology* 2019; 40(4):443–458.
 27. Mojsov K. New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. In: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. ELSEVIER, Amsterdam, Netherlands, 2017:215–222. ISBN: 978-0-444-63505-1.
 28. Motolinía-Alcántara E.A. et al. Engineering considerations to produce bioactive compounds from plant cell suspension culture in bioreactors. *Plants* 2021; 10(12):2762. doi: 10.3390/plants10122762.
 29. Nayak S et al. Biotechnological production of antistress compounds: Current status and future prospects. In: Malik S (eds.) *Exploring Plant Cells for the Production of Compounds of Interest*. Springer, Cham, 2021. doi: 10.1007/978-3-030-58271-5_7.
 30. Nosaki S et al. Transient protein expression systems in plants and their applications. *Plant Biotechnology* 2021; 38(3):297–304.
 31. Pilarek M et al. Impact of operating parameters on values of a volumetric mass transfer coefficient in a single-use bioreactor with wave-induced agitation. *Chemical Engineering Research and Design* 2018; 136:1–10. doi: 10.1016/j.cherd.2018.04.012
 32. Rader RA, & Langer ES. Upstream single-use bioprocessing systems future market trends and growth assessment. *Bioprocess Int* 2011; 10:12–18. doi: 10.1007/s00253-013-4817-x.
 33. Rohini MR, & Rajasekharan PE. Scale-up production of bioactive compounds using bioreactors. In: Belwal T, Georgiev MI, Al-Khayri JM (eds). *Nutraceuticals Production from Plant Cell Factory*. Springer, Singapore, 2022. doi: 10.1007/978-981-16-8858-4_3.
 34. Roosa AE et al. Genetic basis of plasticity in plants. *Journal of Experimental Botany* 2019; 70(3):739–745.
 35. Rozov SM, & Deineko EV. Strategies for optimizing recombinant protein synthesis in plant cells: classical approaches and new directions. *Molecular Biology* 2019; 53(2):157–175.
 36. Schirmer C et al. An overview of drive systems and sealing types in stirred bioreactors used in biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 2021; 105:2225–2242.
 37. Schirmer C et al. Single-use technology for the production of cellular agricultural products: Where are we today? *Chemie Ingenieur Technik* 2022; 94(12):2018–2025.
 38. Seegers CL et al. Production routes toward podophyllotoxin. University of Groningen 2021. doi: 10.33612/diss.168957811.
 39. Shih PM. Towards a sustainable bio-based economy: redirecting primary metabolism to new products with plant synthetic biology. *Plant Sci* 2018; 273:84–91.
 40. Singh V. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnology* 2019; 30:149–158.
 41. Sucholas JO et al. Wild collection of medicinal and aromatic plants (MAPs) in Poland for commercial purposes: a system reviewed. *Herba Polonica* 2021; 67(3):1–18. doi: 10.2478/hepo-2021-0014.
 42. Su YH et al. Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming. *Journal of Integrative Plant Biology* 2021; 63(1):228–243.
 43. Tekoah Y et al. Large-scale production of pharmaceutical proteins in plant cell culture – the Protalix experience. *Plant Biotechnology Journal* 2015; 3:1199–1208.
 44. Valdiani A et al. Bioreactor-based advances in plant tissue and cell culture: challenges and prospects. *Critical Reviews in Biotechnology* 2019; 39(1):20–34.
 45. Verma P et al. Bioreactor upscaling of different tissue of medicinal herbs for extraction of active phytochemicals: a step towards industrialization and enhanced production of phytochemicals in plant growth regulators. In: Aftab T, Ha-keem KR (eds). *Plant Growth Regulators*. Springer, Cham, 2021: 455–481.
 46. Wilson SA, & Roberts SC. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnol J* 2012; 10:249–268.
 47. Zagorskaya AA, & Deineko EV. Plant-expression systems: A new stage in production of biopharmaceutical preparations. *Russian Journal of Plant Physiology* 2021; 68(1):17–30.
 48. Zhou X et al. Current status and major challenges to the safety and efficacy presented by Chinese herbal medicine. *Medicines* 2019; 6(1):14. doi: 10.3390/medicines6010014.

USE OF DISPOSABLE BIOREACTOR SYSTEMS FOR SUSPENSION CULTIVATION OF PLANT CELLS

A.A. DANILOVA, N.S. PIVOVAROVA

St. Petersburg Chemical and Pharmaceutical University Ministry of Health of the Russian Federation

Increased process flexibility and high turnover have led to the introduction of single-use technologies in the pharmaceutical industry. Studies have shown that the use of disposable bioreactors can significantly impact the efficiency of a manufacturing process by reducing capital costs, increasing manufacturing flexibility, reducing product launch time and costs, and reducing the risk of cross-contamination. The variety of bioreactor configurations opens up possibilities for carrying out the process at significantly lower shear rates, which reduces stress on cellular structures.

Keywords: biopharmaceutical production, disposable bioreactors, disposable technologies, culture bags, cultivation of plant cells, suspension cultures, reviews.

Address:

Danilova A.A.

Engineer of the laboratory of additive technologies, assistant
of the department of industrial technology of medicinal products
St. Petersburg Chemical and Pharmaceutical University
Ministry of Health of the Russian Federation
E-mail: shmarova.aleksandra@pharminnotech.com

Для цитирования:

Данилова А.А., Пивоварова Н.С. Использование одноразовых биореакторных систем для суспензионного культивирования растительных клеток. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(1):75–88.

For citation:

Danilova A.A., Pivovarova N.S. Use of disposable bioreactor systems for suspension cultivation of plant cells. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(1):75–88 (in Russian).

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2023 ГОДА

СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

- 1883** — открытие фагоцитоза И.И. Мечниковым.
- 1893** — открытие нитрифицирующих бактерий (С.Н. Виноградский).
- 1903** — датский ботаник Вильгельм Йогансен предложил слово «ген».
- 1913** — выход в свет книги Уильяма Бэтсона «Проблемы генетики».
- 1913** — усовершенствование Каррелем метода культуры клеток.
- 1913** — впервые построена карта гена (А. Стертевант).
- 1923** — открытие Бриджесом транслокаций у дрозофилы.
- 1923** — присуждение Нобелевской премии Ф.Г. Бантингу, Дж. Маклеоду за открытие инсулина.
- 1928** — публикация статей Н.К. Кольцова о принципе самоудвоения наследственной молекулы на русском и немецком языках.
- 1928** — открытие пенициллина А. Флемингом.
- 1928** — английский микробиолог Ф. Гриффит установил, что непатогенный штамм пневмококка может превращаться в патогенный с помощью трансформирующего фактора (оказалось, что это — ДНК).
- 1933** — получение Т.Х. Морганом Нобелевской премии.
- 1933** — использование электрофореза для разделения белков в растворе (Тизелиус).
- 1938** — появление термина «молекулярная биология».
- 1943** — начало массового промышленного производства пенициллина.
- 1953** — публикация в журнале «Nature» статьи Дж. Уотсона и Ф. Крика о структуре ДНК.
- 1953** — получение Нобелевской премии Хансом Кребсом за открытие цикла лимонной кислоты (совместно с Ф. Липманом).
- 1968** — присуждение Нобелевской премии за расшифровку генетического кода М. Ниренбергу, Х.Г. Коране, Р. Холли.
- 1973** — создан первый рекомбинантный организм (С. Коэн, Г. Бойер).
- 1978** — ученые из Гарварда использовали генно-инженерный метод для производства инсулина крыс.
- 1978** — компания Генентех объявила об успешном лабораторном синтезе человеческого инсулина с помощью технологии рекомбинантной ДНК.
- 1983** — присуждение Нобелевской премии Барбаре МакКлинток за открытие транспозирующих (мобильных) генетических систем.
- 1983** — открытие полимеразной цепной реакции (ПЦР) Кэри Мюллисом, который за это был позже удостоен Нобелевской премии.
- 1983** — первая искусственная хромосома.
- 1983** — в лаборатории был получен трансгенный табак.
- 1988** — выделение Конгрессом США средств для финансирования проекта «Геном человека».
- 1988** — основан Национальный центр биотехнологической информации (США).
- 1988** — получен рекомбинантный химозин для производства сыров.
- 1993** — вручена Нобелевская премия по химии Кэри Мюллису за изобретение ПЦР.
- 1998** — создана карта человеческого генома (более 30 тыс. генов) и установлены последовательности 7% генома.
- 1998** — расшифрован геном червя *Caenorhabditis elegans*. Полное завершение проекта — в 2002 году.

2003 — расшифрован полный геном человека (в 2000 году был выпущен рабочий черновик структуры генома).

ПЕРСОНАЛИИ

220 лет со дня рождения и 150 лет со дня смерти Юстуса Либиха (1803–1873), великого немецкого химика.

175 лет со дня рождения Хуго де Фриза (1848–1935), голландского ботаника. В 1900 году вторично открыл законы Менделя (вместе с Корренсом и Чермаком).

160 лет со дня рождения В.И. Вернадского (1863–1945), отечественного ученого-энциклопедиста, автора теории ноосферы.

150 лет со дня рождения Ф.д'Эрелля (1873–1949), канадца по происхождению, микробиолога, одного из основателей учения о бактериофагах.

150 лет со дня рождения Алексиса Карреля (1873–1944), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1912 года. Занимался хирургией сосудов и выращиванием культуры органов.

140 лет со дня рождения немецкого биохимика Отто Варбурга (1883–1970), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1931 года за открытие природы и механизма действия дыхательного фермента.

125 лет со дня рождения и 55 лет со дня смерти У.Х. Флори (1898–1968). За открытие пенициллина и его терапевтического эффекта при лечении различных инфекционных заболеваний ему совместно с А. Флемингом и Э. Чейном в 1945 году была присуждена Нобелевская премия.

125 лет со дня рождения Э.В. Ермольевой (1898–1974), микробиолога и эпидемиолога, создателя антибиотиков, действительного члена АМН СССР.

120 лет со дня рождения А.А. Прокофьевой-Бельговской (1903–1984), известного отечественного цитогенетика.

115 лет со дня рождения М.М. Шемякина (1908–1970), крупного химика-органика, академика АН СССР. Основатель Института химии природных соединений АН СССР (1959), впоследствии переименованного в Институт биоорганической химии (ныне носит его имя и имя Ю.А. Овчинникова).

105 лет со дня рождения Фредерика Сенгера (1918–2013), выдающегося английского биохимика. Дважды лауреат Нобелевской премии по химии (1958 и 1980).

105 лет со дня рождения Артура Корнберга (1918–2007), выдающегося американского биохимика, лауреата Нобелевской премии 1959 г. (совместно с С. Очоа) за исследование механизма биосинтеза РНК и ДНК.

100 лет со дня рождения Д.К. Гайдузека (1923–2008), лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1976 г. (совместно с Б. Бламбергом) за открытие новых механизмов происхождения и распространения инфекционных заболеваний.

100 лет со дня рождения Воробьева Анатолия Андреевича (1923–2006), микробиолога и иммунолога, академика РАМН. Был президентом Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова с 2003 по 2006 гг.

95 лет со дня рождения Дж. Уотсона (род. в 1928 г.), автора (вместе с Ф. Криком) феноменального открытия в молекулярной биологии — двойной спирали ДНК. Лауреат Нобелевской премии 1962 г. (совместно с Ф. Криком и М. Уилкинсом).

40 лет со дня смерти бельгийского биолога Альбера Клода (1899–1983), лауреата Нобелевской премии 1974 г. (вместе с Дж. Паладе и К. де Дювом) за исследования структурной и функциональной организации клетки.

35 лет со дня смерти Ю.А. Овчинникова (1934–1988), крупного отечественного молекулярного биолога, академика, вице-президента АН СССР.

30 лет со дня смерти Северо Очоа (1905–1993), испанца по происхождению, известного энзимолога, лауреата Нобелевской премии 1959 г. (совместно с А. Корнбергом).



К 70-летию со дня рождения профессора Р.Г. Василова

4 января 2023 года исполнилось 70 лет со дня рождения Василова Раифа Гаяновича, доктора биологических наук, профессора, заместителя руководителя по научной работе Курчатовского Комплекса НИЦ «Курчатовский институт», президента Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, главного редактора нашего журнала.

Журнал откликался на разные события в его деятельности. Юбилейная дата дает возможность вновь обратиться к этой теме.

Безусловно, в любой биографии встает вопрос о наследственности. Здесь у Раифа Гаяновича все обстоит благополучно. Вырос он в семье с сильными духовными традициями. Отсюда — тяга к знаниям и отличная учеба в одном из лучших университетов страны: Казанском, с его теперь уже 200-летней историей, освященной выдающимися именами Н.И. Лобачевского и А.М. Бутлерова. Больше того, это учебное заведение всегда характеризовала высокая культура в отношении разработки вопросов химии. Так что и средовые факторы тоже сказали свое решающее слово.

Дальше его путь был предопределен к участию в научно-образовательном прогрессе в данной области знаний. По окончании вузовских занятий — учеба в аспирантуре и работа в столичной химической цитадели, в Институте биоорганической химии АН СССР под руководством академика Ю.А. Овчинникова. Судьбоносной была и продолжительная зарубежная командировка в Германию, которая способствовала

расширению методологического горизонта Р.Г. Василова и задавала еще более высокую планку требований к научному творчеству.

В те годы много значило своевременное овладение методом с использованием моноклональных антител, что позволяло повысить точность анализа иммунологических фактов (на Западе тогда данный метод уже получил развитие и ознакомление с ним из первых рук давало возможность быстрее внедрить его на родине, что и было сделано).

Научные интересы Р.Г. Василова в начале его деятельности были сосредоточены на проблемах иммунологии и иммунобиотехнологии. Со временем они значительно расширились и охватили широкий спектр наиболее приоритетных проблем биотехнологии и молекулярной биологии. В последние годы им уделяется особое внимание вопросам биоэнергетики в контексте применения природоподобных технологий.

В непростые для нашего государства 1990-е годы он возглавлял в Москве НПО «Биотехнология» (в котором работал с 1985 года). Это была хорошая школа для будущей целенаправленной, широкомащтабной деятельности в сфере биотехнологии и молекулярной биологии, получившей особое развитие в 2000-е годы в рамках функционирования Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, в котором он занимает лидирующие позиции. Его знания и опыт всегда были востребованы, о чем свидетельствует в особенности плодотворность труда Р.Г. Василова в НИЦ «Курчатовский институт», где он работает по сей день.

Что отличает Раифа Гаяновича? Это, прежде всего, умение выдерживать многолетнюю доминанту научного поиска, его нацеленность на запланированный позитивный результат, высокая и эффективная коммуникативность в профессиональной среде. Сейчас такими качествами обладают редкие специалисты. Поэтому рядом с ним удерживаются только инициативные работники, настроенные на реальное продвижение вперед и решение трудных, актуальных, социально значимых вопросов.

Существенен и незаменим еще один аспект его деятельности — работа главным редактором журнала, носящего имя его учителя — Юрия Анатольевича Овчинникова. Неизменный оптимистический тонус Р.Г. Василова помогает выдерживать в нем достаточно высокий научно-методический уровень публикаций. Члены редколлегии и редсовета журнала поздравляют его с юбилейной датой и искренне желают ему дальнейших творческих успехов.

К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ АКАДЕМИКА РАМН АНАТОЛИЯ АНДРЕЕВИЧА ВОРОБЬЕВА (1923–2023)

А.Ю. МИРОНОВ^{1,2*}

¹ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,

²Академия постдипломного образования ФМБА России, Москва



5 февраля 2023 года исполнилось 100 лет со дня рождения Анатолия Андреевича Воробьева, выдающегося отечественного ученого-иммунолога, микробиолога, биотехнолога, заслуженного деятеля науки Российской Федерации, лауреата Государственных премий СССР (1980) и Российской Федерации (2001), Премии Правительства Российской Федерации (2000), ветерана Великой Отечественной войны, генерал-майора медицинской службы в отставке, академика РАМН, профессора.

Он родился в городе Курганный Краснодарского края. Окончил Военно-морскую медицинскую академию (ВММА) в г. Ленинграде (1945), адъюнктуру на кафедре физической и коллоидной химии и кафедре

микробиологии ВММА (1951). Работал в НИИ Министерства обороны СССР, Министерстве медицинской и микробиологической промышленности СССР на разных должностях. С 1987 года заведовал кафедрой микробиологии с вирусологией и иммунологией Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова. Под руководством А.А. Воробьева сформирована современная система преподавания микробиологии и иммунологии в медицинских вузах России: созданы современные программы преподавания на лечебном, медико-профилактическом, педиатрическом, стоматологическом, фармацевтическом и ВСО факультетах, изданы 8 учебников, многочисленные учебные пособия, созданы компьютерный атласы и учебники по микробиологии и иммунологии, внедрена рейтинговая система оценки знаний студентов. Им основана отечественная школа микробиологов, иммунологов и биотехнологов. Под его руководством защищено более 30 докторских и 50 кандидатских диссертаций.

В 1960–1980-х годах А.А. Воробьев возглавлял крупные научные коллективы в НИИ Министерства обороны СССР, затем в Главном управлении «Биопрепарат». Под руководством А. А. Воробьева и при его участии решены многие фундаментальные и прикладные проблемы микробиологии, иммунологии и медицинской биотехнологии, среди которых:

1. Разработана теория и практика анатоксинообразования, способы получения очищенных, сорбированных моно- и полианатоксинов, изучены закономерности иммунитета при их применении; созданы и внедрены в практику полианатоксины против столбняка, газовой гангрены и ботулизма (пентаанатоксин, секстаанатоксин).
2. Изучен и впервые сформулирован механизм действия адьювантов как неспецифических стимуляторов иммуногенеза; дана первая классификация иммуномодуляторов (1969), которая усовершенствована применительно к современному учению об иммуномодуляторах (2002).

© 2023 г. Миронов А.Ю.

* Автор для переписки:

Миронов Андрей Юрьевич

д.м.н., профессор, руководитель отдела микробиологии ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора

e-mail: andy.60@mail.ru

3. Разработаны фундаментальные основы и принципы создания химических риккетсиозных вакцин.
4. Создан ряд отечественных вакцин и иммуноглобулинов (ВЭЛ и др.).
5. Получила дальнейшее развитие проблема пероральной вакцинации. Впервые в мировой практике разработаны и доведены до производства живые таблетированные вакцины против оспы, чумы, ВЭЛ. Теория и практика создания пероральных вакцин оказала влияние на исследование по получению пероральных форм других биологически активных веществ (интерферонов, интерлейкинов, гормонов).
6. Впервые в нашей стране изучен и внедрен в практику безыгольный способ введения в организм биологически активных веществ, вакцин, иммуноглобулинов.
7. Накоплен большой производственный опыт проведения биотехнологических процессов, по созданию биотехнологической аппаратуры, по технике безопасности при работе с микробами. По поручению Правительства СССР А.А. Воробьев успешно руководил освоением на Омутнинском химическом заводе хроматографической гриппозной вакцины; возглавлял программу «Ферментная база», выполнение которой обеспечило нашу страну отечественными ферментами обмена нуклеиновых кислот; принимал участие в разработке серии программ по созданию биологически активных лечебных и профилактических препаратов нового поколения (интерферонов, интерлейкинов, гормонов, ВИЧ-вакцины и др.). Разработал первый отечественный генно-инженерный продукт — реаферон.
8. Проведен цикл исследований по дисбиозу и влиянию на нормофлору человека различных факторов.
9. Создан лазерно-флуоресцентный экспресс-метод индикации микрофлоры при гнойно-воспалительных процессах и дисбиозах.
10. Предложена критериально-рейтинговая система определения степени опасности биоагентов, принципы и методы массовой иммунопрофилактики в экстремальных условиях.
11. Он является одним из создателей «биологического щита» Родины.
12. При проведении исследовательских работ большое внимание уделялось биометрике. Впервые в мировой практике разработан способ вычисления LD50 на животных при определении иммуногенности вакцин с использованием метода пробитов

Блисса. Книга «Статистические методы в микробиологических исследованиях» на протяжении 40 лет является настольным руководством для микробиологов.

А.А. Воробьев постоянно выступал с программными докладами по микробиологии, иммунологии, биотехнологии на российских и международных конференциях и съездах, сессиях РАМН, в печати, на телевидении.

Он является автором более 500 научных работ, в том числе 25 монографий, учебников, учебных пособий; он автор более 30 авторских свидетельств СССР и патентов РФ на изобретения.

Большое участие А.А. Воробьев уделял научно-организационной и общественной деятельности. На протяжении трех сроков был заместителем академика-секретаря Отделения профилактической медицины РАМН. Особое внимание Анатолий Андреевич уделял подготовке научных и научно-педагогических кадров высшей квалификации. Более четверти века он работал в ВАКе, являлся заместителем председателя экспертного совета ВАК. С 1991 года и до последних дней был председателем диссертационного совета в ММА им. И.М. Сеченова; председателем Центральной учебно-методической комиссии по преподаванию микробиологии, вирусологии и иммунологии Министерства здравоохранения РФ. Являлся членом редколлегий пяти научных журналов, консультантом Медицинского центра Управления делами Президента России, членом президиума ВОЭМП, членом многих советов при Министерстве здравоохранения и Министерстве науки РФ; был избран членом многих российских и международных академий, первым вице-президентом Российской академии медико-технических наук.

Научная и общественная деятельность А.А. Воробьева высоко оценена Правительством РФ и научной общественностью. За решение научных проблем ему присуждались Государственные премии СССР и РФ, премия Правительства РФ, именные премии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, им. М.П. Чумакова РАМТН. Он удостоен звания «Заслуженный деятель науки РФ», награжден орденами Отечественной войны I степени, Трудового Красного Знамени, двумя орденами Красной Звезды, 19 медалями. За вклад в обороноспособность страны ему присвоено звание генерал-майора медицинской службы. А.А. Воробьев был участником обороны Ленинграда. В последние годы жизни он выполнял важные функции заведующего кафедрой микробиологии с вирусологией и иммунологией Московской медицинской академии им.

И.М. Сеченова, Президента Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Первого вице-президента Академии медико-технических наук РФ.

Журнал «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» откликнулся на знаковые даты в его жизни.

Литература

1. А.А. Воробьев (к 60-летию со дня рождения) // ЖМЭИ. — 1983. — № 5. — С. 115–117.
2. А.А. Воробьев, БМЭ, 1988, том 29, С. 407.
3. Анатолий Андреевич Воробьев (к 70-летию со дня рождения) // Военно-медицинский журнал. — 1993. — № 2. — С. 75–76.
4. Анатолий Андреевич Воробьев (к 70-летию со дня рождения) // ЖМЭИ. — 1993. — № 3. — С. 122–123.
5. Анатолий Андреевич Воробьев // Вестник РАМН. — 1993. — № 2. — С. 57–58.
6. Воробьев Анатолий Андреевич: Врач, ученый, педагог, организатор. — М.: Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 1992. — 40 с.
7. Воробьев А.А. Не подводя черты: Научно-публицистическая повесть. — М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2003. — 440 с.
8. Лебединский В.А., Абдулин Т.А., Евстигнеев В.И., Гарин Н.С., Лукин Е.П. Вклад научно-исследовательского института микробиологии Министерства обороны СССР в разработку проблем инфекционной иммунологии // Военно-медицинский журнал. — 1989. — № 3. — С. 67–71.
9. Миронов А.Ю. Жизнь академика как образец служения науке и Отечеству // Газета «Медицинская академия», 1993. — № 1–2.
10. Миронов А.Ю. Песня, рожденная в окопах // Газета «Медицинская академия», 1995. — № 5.
11. Миронов А.Ю., Петрова Л.И., Болдырев С.Т. Воробьев Анатолий Андреевич — этапы большого пути: К 75-летию со дня рождения. — М.: Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, 1998. — 133 с. — (Лица науки).
12. На службе Родине, сборник воспоминаний выпускников военно-морской медицинской академии. — Ленинград, 1991.

1. *Предметная область.* Принимаются оригинальные и обзорные научные работы по теории, методологии и практике биотехнологии и сопряженных дисциплин: физико-химическая (молекулярная) биология, генная инженерия, геномные и постгеномные технологии, биохимия, биофизика, биоинформатика, микробиология и др.
2. *Общие положения.* Рукописи оформляются в соответствии с общепринятыми требованиями, предъявляемыми к научному исследованию в отношении авторских прав, преемственности, обоснованности целеполагания, достоверности, доказательности, орфографической и стилистической корректности и т.д. В статье должны быть четко обозначены актуальность, научная значимость, методология, цель исследования, результаты и выводы, а также исчерпывающий анализ литературы.
3. Статьи принимаются на русском и английском языках.
4. Объем статьи не должен превышать от 14 до 26 страниц.
5. Оригинальность текста должна составлять не менее 80% (статьи проходят проверку по системе «Антиплагиат»).
6. Для набора текста, формул и таблиц необходимо использовать редактор Microsoft Word для Windows. Параметры текстового редактора: все поля по 2 см; шрифт Times New Roman, размер — 12; межстрочный интервал — 1,5; выравнивание по ширине; абзацный отступ — 1 см; ориентация листа — книжная.
7. Все визуальные объекты должны быть предоставлены в формате, допускающем форматирование. Все файлы рисунков должны быть пронумерованы, а названия рисунков должны быть приведены в конце статьи (например: Рисунок 1. Название рисунка). Любые рисунки (в том числе графики и диаграммы) должны быть информативными как в цветном, так и черно-белом исполнении. Иллюстрации прилагаются в электронном виде в формате JPEG или TIF.
8. Таблицы размещаются в самой статье. Ниже таблицы нужно дать номер таблицы и название (например: Таблица 3. Название таблицы).
9. Оформление мета-данных статьи: 1. Полное название статьи. 2. Укороченный вариант названия статьи (Running title). 3. Ф.И.О. автора статьи. 4. Ученое звание, ученая степень, должность. 5. Место работы: кафедра, факультет, название вуза. 6. Город, страна. 7. Рабочий адрес с почтовым индексом, рабочий телефон. 8. E-mail. 9. Информация о гранте (если есть).
 - Если авторов статьи несколько, то информация повторяется для каждого автора.
 - Возможно при желании сопроводить статью кратким биографическим описанием автора как исследователя (не более 50 слов на английском языке, не более 60 слов на русском языке).
10. Текст статьи должен быть разбит на части, заголовки должны быть подписаны: Аннотация (Abstract). Ключевые слова (Keywords). Введение (Introduction). Материалы и методы (Materials and methods). Литературный обзор (Literature Review). Результаты (Results). Обсуждение (Discussion). Заключение (Conclusion). Благодарности (Acknowledgements). Список литературы (References).
11. Аннотация — оптимальный объем 150 слов (не более 250 слов на русском языке или 200 на английском языке). При этом в случае несоответствия требованию издательство оставляет за собой право частичного изменения и сокращения аннотации. Это же касается и редактирования всего текста рукописи. Аннотация должна включать в себя информацию о цели исследования, методологии, результатах.
12. Ключевые слова — 5–10 слов. Ключевые слова отделяются друг от друга точкой с запятой. Требуется УДК, а также сопроводительное письмо из учреждения.
13. Включить JEL-коды, если применимо.
14. Список литературы приводится в алфавитном порядке, со сквозной нумерацией. Ссылки в тексте на соответствующий источник из списка литературы оформляются в квадратных скобках, например: [1, с. 277]. Использование автоматических постраничных ссылок не допускается. Список литературы

должен содержать не менее 20 источников за последние 3 года (для работ исторического характера могут быть сделаны исключения). Иностраных источников — не менее 15. Преимуществом станет использование статей, опубликованных в базах Scopus и Web of Science.

- Информация о цитируемой статье в журнале должна включать в себя: фамилию и имя автора, год публикации, название статьи, название журнала, том/номер/выпуск, страницы.
 - Информация об упоминаемой книге должна включать в себя: фамилию и имя автора, год публикации, название книги, название издательства, место публикации.
 - В случае с электронным источником информации обязательны ссылка и дата доступа.
 - Необходимо указать тип каждого источника: например, материалы конференции, и т.д. для исключения путаницы при оформлении списка литературы в соответствии с требованиями журнала.
15. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.
 16. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.
 17. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.
 18. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном ранее материале авторов.
 19. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.
 20. Адрес редакции указан на титульном листе журнала.
 21. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию.
 22. Имеется электронный архив журнала на сайте Общества биотехнологии России им. Ю.А. Овчинникова (www.biorosinfo.ru).



Подписано к печати 28.03.2023
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 6,0. Тираж 1000 экз.

ООО «Издательство «БИОСФЕРА»
109147 Москва, ул. Марксистская, 20, стр. 8
Тел.: +7 (495) 763-18-41; E-mail: biosphere@biorosinfo.ru