

**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

2023, Vol. 19, No 2

**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@biosinfo.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

ISSN 1996-4741

© Information and Analytical Center
for Medical and Social Problems, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. Р.Г. Васильев 5

Оригинальные статьи

Оценка показателей качества лиофилизированного набора реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный сухой» («ДЭТ-Аг»).

*А.Г. Кошкидько, И.В. Жарникова, Е.В. Жданова, Д.В. Русанова, О.А. Гнусарева,
М.М. Курноскина, С.А. Курчева, О.В. Васильева, Т.В. Жарникова* 6

Биохимические аспекты обменных процессов у быков-производителей голштинской породы.

Р.У. Зарипов, А.М. Алимов, Н.Р. Касанова, Ф.Р. Зарипов 13

Нейросетевой анализ биокоагуляции биохимических параметров сыворотки крови крыс в исследовании хронической токсичности кормовой добавки на основе экстрактов лекарственных растений.

А.А. Курилова, И.И. Кочши, О.О. Бабиц, Н.И. Воробьев, И.Н. Никонов, Л.Ю. Карпенко 21

Изучение влияния дрожжей местной селекции и различных ферментных препаратов на выход спирта из пшеницы.

Н.Ф. Бирагова, Н.А. Тиникашвили 28

Исследование метрологических характеристик рецепторных систем на основе медиатора ферроцена и бактерий *Pseudomonas putida* BS394(ρBS216) и *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ar для определения фенольного индекса природных вод.

Р.Н. Перчиков, А.С. Харькова, В.А. Арляпов 32

Биогенные элементы в воде и донных отложениях Онежского озера по результатам исследований 2021 и 2022 годов.

М.А. Синякова, Ю.В. Крылова, Л.В. Бронникова 39

Применение полиакролеиновых микросферических носителей в лабораторной диагностике инфекционных болезней.

А.Н. Наркевич, Л.В. Ларионова, Д.И. Симакова, Р.В. Писанов, М.Г. Мелоян 46

Метод определения ДНКазной активности в присутствии интеркалирующего красителя.

*Д.С. Калинин, П.В. Евтехова, Л.Г. Малаев, М.А. Еремина, С.Г. Майоров,
М.Г. Шляпников, И.Э. Грановский* 54

Обзоры

Вариант реализации системы лабораторной установки перфузионной фильтрации для непрерывного культивирования культур клеток.

О.О. Карпова, И.Н. Матвеева 62

Возможности и перспективы оптимизации лабораторной диагностики на основе видеодигитального анализа (обзор).

Д.М. Фролов, Т.В. Замарина, Е.В. Пименова, А.В. Елхова, А.Т. Яковлев 67

Антиоксидантные свойства природных и синтетических химических соединений.

А.И. Исрапилова, А.А. Адиева, А.М. Джафарова 76

Магнитные сорбенты: характеристика, основные способы получения, свойства и их область применения в биомедицине.

*Т.В. Жарникова, Т.В. Таран, Т.В. Бердникова, И.Ю. Борздова, Н.М. Швецова, И.Н. Заикина,
Ю.М. Евченко, В.И. Ефременко, М.Е. Михайлова* 87

Санитарно-бактериологическая характеристика водных объектов и пищевой продукции из рыбы Социалистической Республики Вьетнам.

Л.В. Катаева, Т.Ф. Степанова, А.А. Вакарина, О.В. Посоюзных 100

Правила для авторов 111

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. R.G. Vasilov 5

Original articles

Evaluation of the quality indicators of the lyophilized reagent kit «Diagnosticum erythrocyte tularemia antigenic dry» («DET-Ag»).

A.G. Koshkidko, I.V. Zharnikova, E.V. Zhdanova, D.V. Rusanova, O.A. Gnusareva, M.M. Kurnoskina, S.A. Kurcheva, O.V. Vasilieva, T.V. Zharnikova 6

Biochemical aspects of exchange processes in Holstein-bred bulls.

R.U. Zaripov, A.M. Alimov, N.R. Kasanova, F.R. Zaripov 13

Neural network analysis of bioconsolidation of biochemical parameters of rat blood serum in the study of chronic toxicity of a feed additive based on medicinal plants extracts.

A.A. Kurilova, I.I. Kochish, O.O. Babich, N.I. Vorobyov, I.N. Nikonov, L.Yu. Karpenko 21

Study of the influence of local selection yeast and various enzyme preparations on the yield of alcohol from wheat.

N.F. Biragova, N.A. Tinikashvili 28

Investigation of metrological characteristics of receptor systems based on *Pseudomonas putida* BS394 (PBS216) and *Rhodococcus pyridinivorans* 5AP bacteria to determine the phenolic index in aqueous media.

R.N. Perchikov, A.S. Kharkova, V.A. Arlyapov 32

Biogenic elements in water and bottom sediments of Lake Onega based on the results of studies in 2021 and 2022.

M.A. Sinyakova, Yu.V. Krylova, L.V. Bronnikova 39

Application of polyacrolein microspherical carriers in laboratory diagnostics of infectious diseases.

A.N. Narkevich, L.V. Larionova, D.I. Simakova, R.V. Pisanov, M.G. Meloyan 46

DNase activity assay in the presence of intercalating dye.

D.S. Kalinin, P.V. Evtehova, L.G. Malaev, M.A. Eremina, S.G. Mayorov, M.G. Shlyapnikov, I.E. Granovsky 54

Reviews

A variant implementation of a laboratory perfusion filtration system for continuous cultivation of cell cultures.

O.O. Karpova, I.N. Matveeva 62

Opportunities and prospects for optimizing laboratory diagnostics based on digital video analysis (review).

D.M. Frolov, T.V. Zamarina, E.V. Pimenova, A.V. Elkhova, A.T. Yakovlev 67

Antioxidant properties of natural and synthetic compounds.

A.I. Israpilova, A.A. Adieva, A.M. Jafarova 76

Magnetic sorbents: characteristics, main production methods, properties and their scope in biomedicine.

T.V. Zharnikova, T.V. Taran, T.V. Berdnikova, I.Yu. Borzdova, N.M. Shvetsova, I.N. Zaikina, Yu.M. Evchenko, V.I. Efremenko, M.E. Mikhailova 87

Sanitary-bacteriological characteristics of water bodies and food products from fish of the Socialist Republic of Vietnam.

L.V. Kataeva, T.F. Stepanova, A.A. Vakarina, O.V. Posoyuznykh 100

Rules for authors 111

К читателям

В номере 2 за 2023 год в рубрике «Оригинальные статьи» помещены разноплановые работы по тематике журнала. В исследовании Кошкидько А.Г. с коллегами из Ставропольского научно-исследовательского противочумного института показана перспективность внедрения разработанного ими лиофилизированного набора реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный сухой» («ДЭТ-АГ»).

Специалисты из Казани (Зарипов Р.У. и др.) изучали биохимические показатели крови у быков-производителей с целью коррекции обменных процессов. Представители ветеринарной медицины из Санкт-Петербурга (Курилова А.А. и др.) рассчитывали биоконсолидацию биохимических показателей сыворотки крови лабораторных животных в рамках исследования хронической токсичности новой кормовой добавки на основе экстрактов лекарственных растений.

Бирагова Н.Ф., Тиникашвили Н.А. (Владикавказ) исследовали влияние дрожжей местной селекции и различных ферментных препаратов на выход спирта из пшеницы. Сотрудники Тульского госуниверситета (Перчиков Р.Н. и др.) определяли физико-химические характеристики биосенсора на основе микроорганизмов *Pseudomonas putida* BS394(pBS216), *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ar, постепенно адаптированных к фенолу.

Петербургские ученые (Синякова М.А. и др.) измеряли содержание минерального, общего фосфора и аммонийного азота в воде и донных отложениях Ладожского озера (материалы 2021 г. и 2022 г.). Наркевич А.Н. и др. (Ростовский-на-Дону противочумный институт) применили полиакролеиновые микросферические носители в лабораторной диагностике инфекционных болезней. Группа исследователей из Москвы, Тулы и Пущино (Калинин Д.С. и др.) предложили новый метод определения неспецифической ДНКазной активности в присутствии интеркалирующего красителя Eva Green.

В рубрике «Обзоры» представлен ряд статей. В обзорной статье Карповой О.О., Матвеевой И.Н. из Московской области описывается лабораторная система перфузионной фильтрации для непрерывного культивирования культур клеток. Фролов Д.М. с коллегами (Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт) обсудили возможности и перспективы оптимизации диагностики на основе видеоцифрового анализа. Исрапилова А.И. и др. (Республика Дагестан) в своем обзоре рассмотрели антиоксидантные свойства природных и синтетических соединений. Обзор Жарниковой Т.В. и др. (Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора) посвящен общей характеристике, основным способам получения, свойствам и области применения магнитных сорбентов в биомедицине. Группа сотрудников Тюменского научно-исследовательского института краевой инфекционной патологии (Катаева Л.В. и др.) привела санитарно-бактериологическую характеристику водных объектов и пищевой продукции из рыбы Социалистической Республики Вьетнам.

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

ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ДИАГНОСТИКУМ ЭРИТРОЦИТАРНЫЙ ТУЛЯРЕМИЙНЫЙ АНТИГЕННЫЙ СУХОЙ» («ДЭТ-АГ»)

А.Г. КОШКИДЬКО*, И.В. ЖАРНИКОВА, Е.В. ЖДАНОВА, Д.В. РУСАНОВА,
О.А. ГНУСАРЕВА, М.М. КУРНОСКИНА, С.А. КУРЧЕВА,
О.В. ВАСИЛЬЕВА, Т.В. ЖАРНИКОВА

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора,
Ставрополь

Доказано, что разработанный лиофилизированный набор реагентов «ДЭТ-Аг» чувствителен, специфичен, прост в использовании при осуществлении иммунодиагностики туляремии. В ходе лабораторных исследований экспериментальных серий набора реагентов показана возможность качественного выявления титра антител на клиническом материале (сыворотки крови) в реакции непрямой гемагглютинации. Полученные результаты доказывают преимущества лиофилизированной формы диагностикума по сравнению с жидкой формой: постановка реакции без применения специальной разводящей жидкости; транспортирование при различных температурных режимах; увеличение срока годности в два раза. Полученные результаты указывают на перспективность внедрения разработанного препарата в практику здравоохранения.

Ключевые слова: туляремия; набор реагентов; диагностические препараты; реакция непрямой гемагглютинации; чувствительность; специфичность; стабильность препаратов.

Введение

Иммунодиагностика туляремии основана на индикации и идентификации возбудителя или его специфических антигенов, выявлении антител у человека и восприимчивых животных серологическими методами, в основе которых лежит взаимодействие антигена и антитела с образованием иммунных комплексов [1, 4, 8].

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) является высокочувствительным методом серологической диагностики и используется как для ранней, так и ретроспективной диагностики, а также для определения иммунологического состояния вакцинированных или переболевших людей. Основным компонентом для постановки РНГА является диагностикум эритроцитарный, представляющий собой лиганд, иммобилизованный с

эритроцитами барана (МУ 3.1.2007-05 «Эпидемиологический надзор за туляремией»).

В ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора разработана биотехнология изготовления и осуществляется производство диагностикума эритроцитарного туляремиийного антигенного «РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ» в жидкой форме, требующего определенного режима хранения и транспортирования — от 2 до 8 °С, нарушение которого как в сторону повышения, так и в сторону понижения температуры приводит к полной или частичной потере их биологической активности. В связи с этим нами впервые были получены экспериментальные серии лиофилизированного диагностического набора «ДЭТ-Аг» [2, 3].

Цель исследования — провести контроль физико-химических и иммунобиологических показателей сконструированного набора реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремиийный антигенный сухой» («ДЭТ-Аг»).

Материалы и методы

В работе использовали набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремиийный антигенный жидкий» («РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ») (ФКУЗ

© 2023 г. Кошкидько А.Г., Жарникова И.В., Жданова Е.В., Русанова Д.В., Гнусарева О.А., Курноскина М.М., Курчева С.А., Васильева О.В., Жарникова Т.В.

* Автор для переписки:

Кошкидько Александра Геннадьевна
младший научный сотрудник научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций, ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора
E-mail: koshkidko-94@mail.ru

Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, ФСР 2011/10270 от 17.02.2014 г.) и 6 экспериментальных серий набора реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный сухой» («ДЭТ-Аг») [5, 6].

Постановку РНГА и реакции торможения не прямой гемагглютинации (РТНГА) проводили макро- и микрометодами по стандартной методике, без применения специальной разводящей жидкости (твин 80), используя 0,9%-ный раствор натрия хлорида рН $6,2 \pm 0,2$.

Для контроля аналитической чувствительности применяли экспериментальные гипериммунные туляремийные сыворотки кроликов (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора), сыворотку диагностическую туляремийную сухую для РА (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора), для контроля аналитической специфичности — сыворотку диагностическую холерную О1 адсорбированную сухую для РА (ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора), сыворотку диагностическую сальмонеллезную адсорбированную Ополivalentную для РА (ЗАО «Эколаб»), сыворотку диагностическую поливалентную бруцеллезную сухую для РА (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора).

Для определения диагностической ценности набора реагентов «ДЭТ-Аг» использовали клинический материал (сыворотки крови):

- людей, не болевших ранее туляремией и не вакцинированных против нее — 20 образцов;
- людей, вакцинированных против туляремии — 22 образца;
- людей больных туляремией — 7 образцов.

Работу с клиническим материалом выполняли согласно нормативным документам (МУК 4.2.2939-11 Порядок организации и проведения лабораторной диагностики туляремии для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней). Контроль характеристик набора реагентов «ДЭТ-Аг» проводили согласно разработанной технической документации. Внешний вид и растворимость определяли визуально.

Определение потери в массе при высушивании проводили весовым методом, описанным в ОФС (Общая фармакопейная статья.1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018). Для контроля использовали содержимое ампул в количестве

0,15–0,20 г. Потеря в массе при высушивании не должна превышать 3%.

Аналитическую чувствительность и аналитическую специфичность диагностикума определяли согласно ГОСТ 53022.2-2008 (ГОСТ Р 53022.2-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 2. Оценка аналитической надежности методов исследования — точность, чувствительность, специфичность). Набор должен выявлять в РНГА специфические антитела в сыворотке диагностической туляремийной агглютинирующей в разведении 1:20000 — макрометодом и 1:10000 — микрометодом. Набор не должен давать положительных результатов в РНГА с гетерологичными сыворотками в разведении до $\frac{1}{4}$ их титра. РНГА считают специфичной, если в РТНГА гемагглютинация отсутствует или наблюдается по сравнению с РНГА на 3–4 лунки меньше.

Срок годности и условия хранения устанавливали в ходе изучения стабильности препарата для диагностики *in vitro* в масштабе реального времени (*shelf life*) и ускоренными методами в соответствии с нормативными документами (ГОСТ Р ИСО 23640-2015. Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*; Общая фармакопейная статья 1.1.0009.18. Сроки годности лекарственных средств. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018).

Долгосрочные испытания проводили в рекомендованной для данного диагностического набора реагентов первичной и вторичной упаковке при постоянной верхней (наиболее высокой) температуре установленного режима хранения.

При использовании метода «ускоренного старения» образцы выдерживали при температурах, превышающих температуру его хранения в процессе обращения. При этом температура экспериментального хранения (t_3) должна превышать температуру хранения (t_{xp}) не менее чем на 10 °С. Сроки экспериментального хранения в зависимости от температурного интервала рассчитывали в соответствии с ОФС.

Срок годности (С) рассчитывали по формуле зависимости Вант-Гоффа (1):

$$C = K \times C_3 \quad (1)$$

где K — коэффициент соответствия,
 C_3 — экспериментальный срок годности, сут.

Коэффициент соответствия (K) рассчитывали по формуле (2):

$$K = A \frac{t_{\text{э}} - t_{\text{хр}}}{10} \quad (2)$$

где $t_{\text{хр}}$ — температура хранения,

$t_{\text{э}}$ — температура экспериментального хранения,

A — температурный коэффициент скорости химической реакции (принят равным 2,5).

Диагностическую ценность набора реагентов «ДЭТ-Аг» определяли по ГОСТ 53022.3-2008 (ГОСТ 53022.3-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов).

Результаты и обсуждение

Проведен контроль сконструированных экспериментальных наборов реагентов «ДЭТ-Аг», в состав которых входит: лиофилизированный в защитной среде высушивания диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный 10% сухой (лиофилизированные в среде высушивания эритроциты барана, сенсibilизированные водорастворимым антигеном туляремийного микроба); 50% формализированные эритроциты барана сухие (эритроциты барана, стабилизированные формалином и лиофилизированные в среде высушивания); положительный контрольный образец инактивированный сухой (сыворотка туляремийная в разведении 1:10), взвесь туляремийного микроба инактивированная сухая (*Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в концентрации 1×10^9 м.к./мл).

Контроль качества экспериментальных наборов реагентов «ДЭТ-Аг» проводили по следующим параметрам:

1. Внешний вид.

Диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный 10% сухой, эритроциты барана формализированные 50% сухие — пористые массы, уплотненные в таблетки, коричневого цвета.

Положительный контрольный образец, инактивированный (K^+) сухой и взвесь *F. tularensis*, инактивированная сухая — аморфные массы беловатого цвета.

2. Растворимость.

В течение 30–40 сек содержимое ампулы с диагностикумом эритроцитарным туляремийным антигенным 10% сухим полностью растворялось в 1,0 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия, образуя однородную взвесь коричневого цвета. При стоянии формировалось 2 слоя: прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета

надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, разрушающийся при встряхивании.

В течение 30–40 сек содержимое флакона с формализированными эритроцитами барана 50% сухими полностью растворялось в 2,0 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия, образуя равномерную однородную взвесь коричневого цвета. При стоянии формировалось два слоя: прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета надосадочная жидкость и плотный коричневый осадок, разрушающийся при встряхивании.

В течение 30–40 сек содержимое ампул с положительным контрольным образцом инактивированным (K^+) сухим и взвесью *F. tularensis* полностью растворялось в 1,0 мл дистиллированной воды, после восстановления образовывались прозрачные бесцветные или светло-желтого цвета жидкости.

3. Потеря в массе при высушивании составляла для всех компонентов набора $2,5 \pm 0,5\%$.

4. Определение аналитической чувствительности и аналитической специфичности.

Для определения аналитической чувствительности и аналитической специфичности подготовку наборов реагентов проводили следующим образом: диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный сухой разводили до получения 2,5% рабочего разведения для макрометода и 0,05% — для микрометода; положительный контрольный образец инактивированный (K^+) и гомологичные сыворотки — до разведения 1:2500; взвесь туляремийного микроба — до 5×10^8 м.к./мл для РТНГА.

Гетерологичные сыворотки в разведении 1:10 инактивировали прогреванием при температуре 56 ± 1 °С в течение 30 мин. Для удаления гетерологичных гемагглютинирующих антител инактивированную сыворотку адсорбировали 50% формализированными эритроцитами барана. Смесь выдерживали при температуре 36 ± 1 °С в течение 1 ч. Исследовали полученную надосадочную жидкость, разведенную до 1:50.

В таблице 1 представлены результаты испытаний аналитических чувствительности и специфичности экспериментальных наборов реагентов.

Установлено, что лиофилизированные диагностикумы обладают аналитической чувствительностью, которая составила 1:20000–1:80000 (макрометод) и 1:10000–1:40000 (микрометод) с гомологичными сыворотками, и аналитической специфичностью, о чем свидетельствует отсутствие перекрестных реакций с гетерологичными сыворотками.

Контроль аналитической чувствительности и аналитической специфичности диагностикума эритроцитарного туляремиального антигенного сухого (макро- и микрометод РНГА) (выборочно)

Наименование образца	№ серии			
	с-1		с-3	
	макро	микро	макро	микро
Положительный контрольный образец (K ⁺)	1:80000	1:40000	1:40000	1:20000
Аналитическая чувствительность				
Сыворотка диагностическая туляремиальная сухая для РА	1:40000	1:20000	1:20000	1:10000
Сыворотки гипериммунные туляремиальные №№ 35, 37 от 2018 г.	1:40000	1:20000	1:20000	1:10000
Сыворотка гипериммунная туляремиальная № 42 от 2019 г.	1:80000	1:40000	1:40000	1:20000
Сыворотки гипериммунные туляремиальные №№ 46, 48 от 2020 г.	1:80000	1:40000	1:40000	1:20000
Сыворотка гипериммунная туляремиальная № 50 от 2021 г.	1:40000	1:20000	1:40000	1:20000
Аналитическая специфичность				
Сыворотка диагностическая поливалентная бруцеллезная сухая для РА	РЕЗУЛЬТАТЫ В РНГА ОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ			
Сыворотка поливалентная сальмонеллезная адсорбированная сухая О- для РА (А, В, С, Д, Е)				
Сыворотка холерная О1 адсорбированная сухая для РА				

После проведения контрольных исследований полученных экспериментальных наборов реагентов «ДЭТ-Аг» проводили испытания по определению стабильности показателей качества препарата. Срок годности и условия хранения устанавливали в ходе изучения стабильности лиофилизированных эритроцитарных диагностикумов в масштабе реального времени (*shelf life*) и ускоренными методами исследования в соответствии с нормативными документами [7].

Метод «ускоренного старения» позволяет рассчитать сроки хранения при различных температурах и сделать прогноз срока годности готового изделия. Экспериментальные образцы набора выдерживали при температуре 27 ± 1 °С в течение 116 сут, 37 ± 1 °С в течение 47 сут. Для постановки контрольных испытаний использовали по 3 образца каждой серии. За образец принимали содержимое одного набора. Контрольные исследования при «ускоренном старении» проводили с интервалом 15 дней для температуры 27 ± 1 °С, 10 дней — для температуры 37 ± 1 °С. Для вычисления срока годности и коэффициента соответствия (К) использовали формулы (1), (2). В результате срок годности при экспериментальной температуре 27 ± 1 °С (К=6,3) составил 730,8 сут; при 37 ± 1 °С (К=15,6) — 733,2 сут.

При этом установлено, что в течение двух лет физико-химические и иммунобиологические показатели наборов реагентов, независимо от температуры и временных интервалов, остаются стабильными, что соответствует требованиям нормативной документации.

Данные, полученные с использованием метода «ускоренного старения», были подкреплены изучением

стабильности в условиях долгосрочных испытаний в течение всего заявленного срока годности. Для этого контрольные исследования экспериментальных серий набора при хранении в потребительской упаковке с учетом регламентированной температуры от 2 до 8 °С проводили через каждые три месяца в течение первого года хранения и шести месяцев в течение заявленного периода испытаний (30 месяцев). Установлено, что все образцы сохраняли стабильность в течение 24 месяцев наблюдения. По окончании 30 месяцев хранения при указанной температуре во всех образцах наблюдалось изменение по показателю «растворимость» одного из компонентов, проявляющееся в отсутствии гомогенности взвеси при растворении и образовании хлопьевидного осадка, не разбивающегося при встряхивании.

При изучении стабильности основных показателей качества разработанных эритроцитарных препаратов (лиофилизатов) также учитывали температуры различных климатических зон. Были проведены контрольные исследования полученных экспериментальных серий диагностикумов при имитации условий транспортирования в потребительской упаковке с учетом регламентированной температуры в условиях повышенных и пониженных температур при 30 ± 5 °С и минус 30 ± 5 °С соответственно. Для каждой постановки контрольных испытаний использовали по одному образцу из серии. За один образец принимали содержимое одного набора. При постановке РНГА в контролируемых наборах реагентов отмечено полное сохранение первоначальных физико-химических и иммунобиологических свойств

препарата. Отрицательного влияния вышеуказанных температур на результаты контролируемых показателей не выявлено. В результате было установлено, что лиофилизированные формы диагностикума стабильны при различных температурных режимах в течение 8 дней.

Для подтверждения диагностической ценности наборов реагентов испытания проводили на клиническом материале (табл. 2). Сыворотки крови предварительно инактивировали 30 мин при температуре 56 ± 1 °С и адсорбировали 50% эритроцитами барана.

Таблица 2

Результаты испытаний диагностических наборов реагентов (жидкого и сухого) на клиническом материале: микрометод РНГА и РТНГА (выборочно)

Наименование образца	№ серии					
	«РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ»		«ДЭТ-Аг»			
	с 3-21		с-1		с-3	
	РНГА	РТНГА	РНГА	РТНГА	РНГА	РТНГА
Сыворотки, полученные от людей, не болевших ранее туляремией и не вакцинированных против нее						
Сыворотки №№ 24, 27, 32, 36, 40	отр	отр	отр	отр	отр	отр
Сыворотка № 35	1:160	отр	1:160	отр	1:160	отр
Сыворотка № 41	1:320	отр	1:320	отр	1:320	отр
Сыворотки, полученные от людей, вакцинированных против туляремии						
Сыворотка № 3	1:1280	1:80	1:1280	1:80	1:1280	1:80
Сыворотка № 4	1:320	отр	1:320	отр	1:320	отр
Сыворотка № 12	1:1280	отр	1:1280	отр	1:1280	отр
Сыворотка № 15	1:640	отр	1:640	отр	1:640	отр
Сыворотка № 19	1:1280	1:40	1:1280	1:40	1:1280	1:40
Сыворотка № 21	отр	отр	отр	отр	отр	отр
Сыворотки, полученные от больных людей туляремией						
Сыворотка № 43	1:640	отр	1:640	отр	1:640	отр
Сыворотка № 45	1:1280	1:40	1:1280	1:40	1:1280	1:40
Сыворотка № 47	1:1280	отр	1:1280	отр	1:1280	отр

В результате было установлено, что диагностическая чувствительность составила 96%. Диагностическая специфичность — 90%. Данные РНГА и РТНГА лиофилизованного и жидкого диагностикумов полностью совпадали.

Заключение

Проведенные исследования показали, что экспериментальный набор реагентов «ДЭТ-Аг» по физико-химическим и иммунобиологическим показателям соответствует всем требованиям нормативной документации.

Аналитическая чувствительность составила 1:20000–1:80000 (макротест) и 1:10000–1:40000 (микротест), аналитическая специфичность — отсутствуют перекрестные реакции с гетерологичными сыворотками.

Преимуществом лиофилизированных форм диагностикума эритроцитарного туляремийного антигенного является увеличение срока годности в два раза по сравнению с жидкой формой набора реагентов, возможность

постановки реакции без использования разводящей жидкости и транспортирования при разных температурных режимах. Экспериментально доказано, что в течение этого периода времени качественные показатели набора реагентов остаются стабильными.

Диагностическая ценность набора реагентов «ДЭТ-Аг» доказана на клиническом материале (всего 49 проб) и соответствует требованиям, предъявляемым к индикаторным препаратам.

Литература

1. Жарникова И.В., Ефременко В.И., Жарникова Т.В., Курчева С.А., Кальной С.М., Ефременко Д.В. и др. Серологические методы выявления возбудителя туляремии и их оценка // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2019. — № 4. — С. 32–38.
2. Кошкидько А.Г., Курчева С.А., Жарникова И.В., Старцева О.Л. Разработка защитной среды высушивания для стабилизации эритроцитарного антигенного диагностикума // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2020. — Т. 16. — № 4. — С. 12–16.

3. Кошкидько А.Г., Семирчева А.А., Курноскина М.М. Конструирование эритроцитарного антигенного туляремийного диагностикума в лиофилизированной форме / Горизонты биотехнологии: материалы Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых. — Орел: Издательство ОГУ имени И.С. Тургенева, 2021. — С. 132–135.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В. Специфическая индикация патогенных биологических агентов. Практическое руководство. 2-е изд., перераб. и доп. — Саратов: ООО «Буква», 2014. — 284 с.
5. Патент 2708636 РФ. Универсальная среда высушивания для стабилизации эритроцитарных диагностикумов туляремийных. Жарникова И.В., Курчева С.А., Жданова Е.В., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н. и др. Бюл. изобрет. 2019. № 34.
6. Патент 2749355 РФ. Способ лиофилизации эритроцитарных диагностикумов туляремийных. Кошкидько А.Г., Жарникова И.В., Курчева С.А., Жданова Е.В., Семирчева А.А. и др. Бюл. изобрет. 2021. № 16.
7. Старцева О.А., Курчева С.А. Прогнозирование сроков годности иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих туляремийных сухих // Здоровье населения и среда обитания. — 2019. — № 2(311). — С. 56–60.
8. Сырова Н.А., Терешкина Н.Е., Девдариани Э.Л. Современное состояние иммунодиагностики туляремии // Проблемы особо опасных инфекций. — 2008. — № 3(97). — С. 12–15.
- Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 2019; 4:32–38 (in Russian).
2. Koshkid'ko AG, Kurcheva SA, Zharnikova IV, Startseva OL. Razrabotka zashchitnoy sredy vysushivaniya dlya stabilizatsii eritrotsitarnogo antigennoy diagnostikuma. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova 2020; 16(4):12–16 (in Russian).
3. Koshkid'ko AG, Semircheva AA, Kurnoskina MM. Konstruirovaniye eritrotsitarnogo antigennoy tulyaremiynogo diagnostikuma v liofilizirovannoy forme. Gorizonty biotekhnologii: materialy Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii studentov i molodykh uchenykh. Orel: Izdatel'stvo OGU imeni IS Turgeneva, 2021; 132–135 (in Russian).
4. Onishchenko GG, Kutyrev VV. Spetsificheskaya indikatsiya patogennykh biologicheskikh agentov. Prakticheskoye rukovodstvo. 2-ye izd, pererab i dop. Saratov: ООО «Буква», 2014; 284 (in Russian).
5. Patent 2708636 RF. Universal'naya sreda vysushivaniya dlya stabilizatsii eritrotsitarnykh diagnostikumov tulyaremiynykh. Zharnikova IV, Kurcheva SA, Zhdanova YeV, Tyumentseva IS, Afanas'yev YeN i dr. Byul izobret 2019. № 34 (in Russian).
6. Patent 2749355 RF. Sposob liofilizatsii eritrotsitarnykh diagnostikumov tulyaremiynykh. Koshkid'ko AG, Zharnikova IV, Kurcheva SA, Zhdanova YeV, Semircheva AA i dr. Byul izobret 2021. № 16 (in Russian).
7. Startseva OA, Kurcheva SA. Prognozirovaniye srokov godnosti immunoglobulinov diagnosticheskikh fluorestsiruyushchikh tulyaremiynykh sukhikh. Zdorov'ye naseleniya i sreda obitaniya 2019; 2(311):56–60 (in Russian).
8. Syrova NA, Tereshkina NYe, Devdariani ZL. Sovremennoye sostoyaniye immunodiagnostiki tulyaremi. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2008; 3(97):12–15 (in Russian).

References

EVALUATION OF THE QUALITY INDICATORS OF THE LYOPHILIZED REAGENT KIT «DIAGNOSTICUM ERYTHROCYTE TULAREMIA ANTIGENIC DRY» («DET-AG»)

A.G. KOSHKIDKO, I.V. ZHARNIKOVA, E.V. ZHDANOVA, D.V. RUSANOVA,
O.A. GNUSAREVA, M.M. KURNOSKINA, S.A. KURCHEVA,
O.V. VASILIEVA, T.V. ZHARNIKOVA

Stavropol Antiplague Institute of Rospotrebnadzor, Russian Federation, Stavropol

It has been proven that the developed lyophilized reagent kit is sensitive, specific, and easy to use in the immunodiagnosis of tularemia. In the course of laboratory studies of experimental batches of the «DET-AG» reagent kit, the possibility of qualitative detection of antibody titer on clinical material (blood serum) in the indirect hemagglutination test was shown. The obtained results prove the advantages of the lyophilized form of the diagnosticum in comparison with the liquid form: setting up the reaction without the use of a special diluting liquid; transportation under various temperature conditions; doubling the shelf life. The results obtained indicate the prospects for introducing the developed drug into healthcare practice.

Keywords: tularemia; a set of reagents; diagnostic preparations; indirect hemagglutination reaction; sensitivity; specificity; drug stability.

Address:

Koshkidko A.G.

Junior researcher, research and production laboratory
of preparations for the diagnosis of especially dangerous
and other infections, Stavropol Anti-Plague Institute
of Rospotrebnadzor

E-mail: koshkidko-94@mail.ru

Для цитирования:

Кошкидько А.Г., Жарникова И.В., Жданова Е.В., Русанова Д.В., Гнусарева О.А., Курноскина М.М., Курчева С.А., Васильева О.В., Жарникова Т.В. Оценка показателей качества лиофилизированного набора реагентов «Диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный сухой» («ДЭТ-Аг»). Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(2):6–12.

For citation:

Koshkidko A.G., Zharnikova I.V., Zhdanova E.V., Rusanova D.V., Gnusareva O.A., Kurnoskina M.M., Kurcheva S.A., Vasilieva O.V., Zharnikova T.V. Evaluation of the quality indicators of the lyophilized reagent kit «Diagnosticum erythrocyte tularemia antigenic dry» («DET-Ag»). Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(2):6–12 (in Russian).

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОБМЕННЫХ ПРОЦЕССОВ У БЫКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОДЫ

Р.У. ЗАРИПОВ¹, А.М. АЛИМОВ¹, Н.Р. КАСАНОВА^{1*}, Ф.Р. ЗАРИПОВ²

¹ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана», Казань,

²АО Головное Племенное Предприятие «Элита», Казань, Высокогорский район, с. Высокая гора, Республика Татарстан

Контроль состояния обмена веществ и резистентности организма имеет важное значение для обеспечения здоровья и длительного продуктивного использования быков-производителей. В этом плане важную роль играют биохимические и иммунологические исследования, позволяющие установить направленность обмена веществ и функциональное состояние физиологических систем организма животных. В работе представлены результаты изучения биохимических показателей крови быков-производителей голштинской породы в разные сезоны года. Удалось выявить отклонения по таким важным показателям состояния организма, как общий белок, креатинин, билирубин, активность печеночных ферментов (АЛТ, АСТ, ЩФ), концентрация триглицеридов, активность липазы и амилазы, а также минерального обмена (калий, фосфор, натрий, магний, железо и др.). Полученные данные свидетельствуют о нарушениях белкового, липидного, углеводного, минерального обменов и, как следствие, необходимости коррекции метаболизма у животных.

Ключевые слова: биохимия крови, быки-производители, обмен веществ.

Введение

Состояние обмена веществ во многом определяет здоровье животных. Биохимические параметры крови позволяют судить о состоянии обмена веществ во всем организме, которые у здоровых животных постоянны и строго специфичны. Исходя из этого, мониторинг обмена веществ у быков-производителей является весьма актуальным, так как, контролируя состав крови, можно определить параметры их здоровья, сбалансировать рационы кормления и принять меры по профилактике и терапии патологических состояний [16].

Дальнейшее увеличение производства молока и говядины зависит от использования высокопродуктивных животных, обладающих высоким генетическим потенциалом, выраженной адаптационной способностью, устойчивостью к заболеваниям и пригодных к длительному хозяйственному использованию [1, 5, 11]. Однако интенсификация скотоводства и стремление к достижению максимальной продуктивности животных часто приводят к метаболической переориентации организма,

что нередко сопровождается заметной напряженностью всех систем и функций организма и снижением резистентности животных [2, 3, 7, 8, 9].

В результате влияния различных неблагоприятных факторов на организм возникают иммунодефицитные состояния, при которых наблюдается снижение, либо выпадение одного или нескольких показателей иммунитета [2, 3, 6, 7, 10]. Поэтому важен систематический мониторинг за состоянием обмена веществ и направленностью биохимических процессов организма высокопродуктивных и племенных животных [9, 12, 13, 18]. На основании определения отдельных биохимических и клеточно-гуморальных показателей крови можно установить состояние обмена веществ в организме и своевременно принять эффективные меры для коррекции нарушений обменных процессов и восстановления резистентности животных [14, 15, 19, 20].

В племенной работе с молочными породами крупного рогатого скота основное внимание уделяется наследственным факторам передачи высоких показателей продуктивности и в меньшей степени учитывается наследственная передача потомству возможностей общей и специфической резистентности организма. По-видимому, этим объясняется то, что высокопродуктивные животные наиболее восприимчивы ко многим болезням, как инфекционной, так и незаразной этиологии. Поэтому проблема оценки состояния здоровья, адаптационных возмож-

© 2023 г. Зарипов Р.У., Алимов А.М., Касанова Н.Р., Зарипов Ф.Р.

* **Автор для переписки:**

Касанова Надия Радиковна

канд. с.-х. наук, доцент кафедры биохимии, физики и математики Казанской ГАВМ имени Н.Э. Баумана

E-mail: nadia-kasanova@mail.ru

ностей, пред- и субклинического состояния организма высокопродуктивных и племенных животных является актуальной проблемой в ветеринарии [17].

С учетом изложенного цель исследований заключалась в оценке биохимических аспектов состояния обменных процессов у быков-производителей голштинской породы в Республике Татарстан.

Материалы и методы

Объектами исследований служили 30 быков-производителей голштинской породы головного племенного предприятия «Элита» Республики Татарстан.

Кровь для исследований брали из подхвостовой вены утром до кормления. Сыворотку крови получали общепринятым методом.

Биохимические параметры сыворотки крови быков определяли на анализаторе Chem-ray 240 с использованием набора реактивов Биовет-тест (Россия) по следующим показателям: общий белок — ТР-фотометрический тест на основе биуретовой реакции; альбумины — фотометрический тест с бромкрезоловым зеленым; аспаратаминотрансфераза (АСТ) и аланинаминотрансфераза (АЛТ) — УФ тест без пиридоксальфосфата по методу Рейтмана—Френкеля, билирубин общий — фотометрический тест с 2,4-дихлоранилином, билирубин прямой — фотометрический тест с 2,4-дихлоранилином; креатинин — по реакции Яффе без компенсации; креатининкиназа — оптимизированный УФ-тест; амилаза — ферментативный фотометрический тест с использованием субстрата EPS-G7; липаза — ферментативный колориметрический тест; мочевины (UREA) — кинетический, уреазный-глутаматдегидрогеназный УФ тест (GPO-PAP); триглицериды — ферментативный фотометрический тест (GPO-PAP); холестерин (CHOL) — ферментативный фотометрический тест (CHOD-PAP); щелочная фосфатаза — кинетический фотометрический тест; глюкоза — ферментативный фотометрический тест (GOD-PAP);

фосфор (PO₃) — молибдат UV, биореагентом (запуск субстратом); хлориды — фотометрический метод с тиоцианатом ртути; натрий — ферментативной реакцией; калий — ферментативной реакцией; магний — фотометрический тест с ксимидиновым синим; кальций — фотометрический метод с О-крезолфталенином. Железо определяли по методу Сенделя фотоколориметрически с использованием паранитрофенола. Каротин определяли фотометрическим методом с использованием ксиллооктановой смеси [4].

Исследования проводили в весенний, летний и зимний сезоны года.

Содержание животных стойловое. Рационы кормления составлялись с учетом живой массы и возраста быков, были в основном сбалансированы по содержанию сухого вещества, обменной энергии, протеина и другим элементам. Однако при тщательном анализе были отмечены отклонения по отдельным показателям. В частности, наблюдались превышение количества сырого протеина и натрия, несоответствие соотношений кальций:фосфор, а также недостаток каротина, магния, углеводов и другие.

Результаты

Обмен веществ и энергии обеспечивает жизнедеятельность организма. Образующиеся в процессе обмена веществ энергия и метаболиты используются для поддержания температуры тела, роста, развития, продуктивности, биосинтетических процессов, обеспечения структуры и функций всех клеточных элементов и органов. Нарушение основного обмена приводит к различным патологическим состояниям. Поэтому мониторинг за состоянием обмена веществ является важным диагностическим инструментом.

Результаты определения отдельных показателей, характеризующих обменные процессы у быков-производителей весной обобщены в таблице 1.

Таблица 1

Биохимический состав крови быков (весенний период)

Показатели	Ед. изм.	Реф. знач.	Количество		Количество проб, %	
			min	max	выше N	ниже N
Гемоглобин	г/л	99,0–129,0	76,3	81,7	0	100,0
Общий белок	г/л	61,6–82,2	79,7	99,9	70%	0
Альбумин	г/л	30,0–50,0	44,8	97,3	0	0
Каротин	мг%	0,9–2,3	0,03	0,09	0	100,0
Глюкоза	мкмоль/л	2,2–3,3	0,22	4,67	30,0	10,0
Креатинин	мкмоль/л	55,8–162,4	140,2	197,1	60	0

Креатинкиназа	ед/л	40,0–228,0	173,5	321,2	50,0	0
АЛТ	ед/л	6,9–35,0	19,2	34,1	0	0
АСТ	ед/л	45,3–110,2	76,0	123,3	20,0	0
ЦЩФ	ед/л	50,0–200,0	107,2	332,7	40,0	0
ЦЩР	об. % CO ₂	46,0–66,0	42,2	48,3	10,0	10,0
Мочевина	мкмоль/л	2,8–8,8	4,64	6,34	0	0
Общий билирубин	мкмоль/л	61,6–82,2	29,7	41,2	0	100,0
Прямой билирубин	мкмоль/л	0,1–0,4	0,1	2,0	60,0	0
Триглицериды	мкмоль/л	0,2–0,6	0,11	0,16	100,0	0
Кетоновые тела	мг%	1,0–9,0	6,5	12,2	10,0	0
Холестерин	мкмоль/л	1,3–5,0	1,37	2,84	0	0
Липаза	ед/л	50,0–350	7,97	10,5	0	100,0
α -амилаза	ед/л	405,0–1337,0	267,4	396,4	0	100,0
Кальций	ммоль/л	2,5–3,3	2,6	2,97	0	0
Фосфор	ммоль/л	1,4–1,9	2,0	3,23	100,0	0
Соотношение Са:Р	ед	1:1,7–1,8	0,9	1,3	0	100,0
Калий	ммоль/л	3,5–5,1	5,8	7,33	100,0	0
Натрий	ммоль/л	136,0–146,0	185,5	218,7	100,0	0
Хлориды	ммоль/л	95,7–108,0	102,4	105,1	0	0
Магний	ммоль/л	0,7–1,1	0,57	1,88	0,0	30
Железо	ммоль/л	16,1–19,7	10,2	16,8	0,0	40,0

Анализируя полученные данные, следует отметить, что в состоянии обмена веществ у быков выявились серьезные нарушения. Так, у 70% животных оказалась гиперпротеинемия. В сыворотках их крови по сравнению с физиологической нормой (61,6–82,2 г/л) превышение содержания общего белка варьировало от 14,0 до 17,6% ($p < 0,01$), что обусловлено белковым перекормом и гиподинамией. При этом содержание альбуминов, в основном, соответствовало физиологической норме (30,0–50,0 г/л). В 60% проб наблюдалось повышение содержания креатинина от 1,1 до 12,0% ($p < 0,05$). Повышение уровня креатина свидетельствует о почечной недостаточности и гепатозах. Активность креатинкиназы была повышена у 30% быков от 14,1 до 40,8% ($p < 0,01$) по сравнению с физиологической нормой.

Содержание мочевины, являющейся конечным продуктом азотистого обмена и синтезируемой в печени, а у жвачных животных — частично в стенке рубца, соответствует физиологическим показателям (50,0–200,0 ммоль/л).

Белковый перекорм, нарушение протеино-углеводного и кальций-фосфорного соотношений способствовали развитию ацидоза, о чем свидетельствуют низкие показатели ЦЩР и ЦЩФ, превышение уровня кетоновых тел у 10–12% животных.

Концентрация общего билирубина оказалась повышенной по сравнению с физиологической нормой (1,8–10,00 мкмоль/л) у всех исследованных животных

в 3–4 раза ($p = 0,05$). Это также свидетельствует о нарушении обменных процессов, патологии печени и почек.

Активность АСТ оказалась повышенной у 20% животных, ЦЩФ — у 40%. У 30% быков отмечается гипогликемия и у 10% — гипергликемия.

Концентрация триглицеридов, активность липазы и амилазы оказались ниже физиологических показателей у 100% животных, хотя и уровень холестерина соответствовал референсным значениям.

Для нормального функционирования систем организма важное значение имеет минеральный обмен. Поэтому содержание минеральных элементов определяют не только в кормах, но и в крови и других биологических объектах.

В результате анализа определен дисбаланс регистрируется и в минеральном обмене: нарушено соотношение кальций:фосфор, наблюдается превышение содержания калия и натрия у 100% животных на фоне низкого уровня магния и у 30% животных — дефицит железа. Содержание хлоридов соответствовало физиологическим показателям. Низкие показатели магния, по-видимому, обусловлены превышением уровня фосфора.

Полученные данные свидетельствуют о существенном дисбалансе белкового, липидного, углеводного и минерального обменов у быков и необходимости коррекции состояния метаболизма.

Следующую серию исследований проводили в летний период. Результаты анализа биохимических показателей обобщены в таблице 2.

Таблица 2

Биохимический состав крови быков (летний период)

Показатели	Ед. изм.	Реф. знач.	Количество		Количество проб, %	
			min	max	выше N	ниже N
Гемоглобин	г/л	99,0–129,0	81,1	108,5	0	10,0
Общий белок	г/л	61,6–82,2	107,4	211,7	100,0	0
Альбумин	г/л	30,0–50,0	11,7	15,7	0	100,0
Каротин	мг%	0,9–2,3	0,11	0,30	0	100,0
Глюкоза	мк моль/л	2,2–3,3	0,64	3,72	0	83,3
Креатинин	мк моль/л	55,8–162,4	99,7	214,7	66,7	0
Креатинкиназа	ед/л	40,0–228,0	102,8	786,6	40,0	3,3
АЛТ	ед/л	6,9–35,0	21,1	34,8	0	0
АСТ	ед/л	45,3–110,2	58,9	251,2	73,3	0
ЩФ	ед/л	50,0–200,0	53,8	673,2	46,7	0
ЩР	об.% CO ₂	46,0–66,0	43,7	49,7	10,0	12,0
Мочевина	мкмоль/л	2,8–8,8	5,8	8,5	0	0
Общий билирубин	мкмоль/л	61,6–82,2	19,4	31,8	10,0	100,0
Прямой билирубин	мкмоль/л	0,1–0,4	0,11	2,29	76,6	3,3
Триглицериды	мкмоль/л	0,2–0,6	0,06	0,18	10,0	100,0
Кетоновые тела	мг/л	2,0–9,0	6,0	12,0	13,0	0
Липаза	ед/л	50,0–350,0	0,7	21,3	0	100,0
Холестерин	мкмоль/л	1,3–5,0	1,76	3,07	0	0
α -амилаза	ед/л	405,0–1337,0	105,2	234,5	0	100,0
Кальций	мкмоль/л	2,5–3,3	2,38	2,76	0	36,6
Фосфор	мкмоль/л	1,4–1,9	1,7	2,11	36,6	0
Соотношение Ca/P	ед	1:1,7–1,8	1,1	1,5	0	100,0
Калий	мкмоль/л	3,5–5,1	4,04	5,08	0	0
Натрий	мкмоль/л	136,0–146,0	151,6	177,3	100,0	0
Магний	мкмоль/л	0,7–1,1	0,14	0,59	0	100,0
Хлориды	мкмоль/л	95,7–108,0	121,7	127,7	100,0	0
Магний	мкмоль/л	0,7–1,1	0,56	1,0	0	30,0
Железо	мкмоль/л	16,1–19,7	11,3	18,9	0	30,0

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что в состоянии обмена веществ в летний период существенного улучшения не произошло по сравнению с весной. Наоборот, гиперпротеинемия охватила всех 30 быков на фоне гипоальбуминемии. Недостаток каротина несколько снизился.

Поголовье с повышенным содержанием креатинина и АСТ возросло на 6,7% и 53,3% соответственно. Более высокие показатели прямого билирубина наблюдались у 76,6% быков. Во всех исследованных пробах крови, как весной, так и летом оказалось недостаточное содержание триглицеридов и низкие

показатели активности липазы и амилазы. Состояние минерального обмена у быков в летний период также не улучшилось.

На основании полученных данных нами были проведены анализы кормов и рационов, на основе которых внесены определенные корректировки. В частности, на 2,6% было снижено содержание протеина, количество жира увеличено на 1%, крахмала — на 6,6%, амилазы — на 6,6%.

Следующий анализ биохимических показателей крови быков проводили после корректировки их рационов в зимний период (табл. 3).

Биохимический состав крови быков (зимний период)

Показатели	Ед. изм.	Реф. знач.	Количество		Количество проб %	
			min	max	выше N	ниже N
Гемоглобин	г/л	99,0–129,0	78,3	81,7	0	10,0
Общий белок	г/л	61,6–82,2	67,7	97,3	50,0	0
Альбумин	г/л	30,0–50,0	11,1	14,4	0	100,0
ЦФ	ед/л	50,0–200,0	53,8	673,2	60,0	0
ЦР	об. % CO ₂	46–66	41,8	49,7	0	15,0
Каротин	мг%	0,9–1,0	0,12	0,33	0	100,0
Глюкоза	мкмоль/л	2,2–3,3	1,11	3,31	0	100,0
АЛТ	ед/л	6,9–35,0	20,7	34,8	0	0
АСТ	ед/л	45,3–110,2	58,9	367,3	63,3	0
Креатинин	мкмоль/л	55,8–162,4	99,7	211,7	63,3	0
Мочевина	мкмоль/л	2,8–8,8	5,8	8,9	100,0	0
Креатинкиназа	ед/л	44,0–228,0	139,2	786,6	46,7	10
Общий билирубин	мкмоль/л	1,8–10,0	19,4	31,8	100,0	0
Триглицериды	мкмоль/л	0,2–0,6	0,06	0,22	0	100,0
Кетоновая кислота	мг %	2,0–90	8,4	11,7	12,0	0
Холестерин	мкмоль/л	1,3–5,0	1,95	3,07	0	0
Липаза	ед/л	50,0–350	9,72	21,3	0	100,0
α -амилаза	ед/л	405,0–1337,0	105,7	237,3	0	100,0
Фосфор	мкмоль/л	1,4–1,9	1,71	2,29	40,0	0
Кальций	мкмоль/л	2,5–3,3	2,40	2,80	0	20,0
Соотношение Ca/P	ед	1:1,7–1,8	1,4	0,1	0	100
Калий	мкмоль/л	3,5–5,1	4,36	5,08	0	0
Магний	мкмоль/л	0,7–1,1	0,15	0,61	0	100,0
Натрий	мкмоль/л	136,0–146,0	152,9	177,3	100,0	0
Хлориды	мкмоль/л	95,7–108,0	121,7	127,7	100,0	0
Железо	мкмоль/л	16,1–19,7	10,9	19,2	0	45,0

Анализируя полученные данные, следует отметить относительную стабилизацию содержания общего белка у определенного числа быков (50%).

Однако нужно подчеркнуть, что в целом состояние обменных процессов осталось на прежнем уровне, что диктует необходимость принятия радикальных мер по коррекции рационов быков-производителей, усиления активного моциона животных и применения лекарственных средств.

Заключение

Проведенные нами биохимические исследования крови быков-производителей в разные сезоны года позволили выявить существенные нарушения обмена веществ. Избыточный белковый перекорм и гиподинамия привели к повышенному содержанию в сыворотках крови общего протеина, повышению уровня фосфора

и недостатку каротина, магния. Гиперпротеинемия на фоне низкого содержания углеводов и каротина способствовала усиленному использованию триглицеридов в качестве энергетического источника. У значительной части животных отмечается железодефицитная анемия на протяжении всего срока наблюдений, содержание железа было достаточно низким, у части животных оно не доходило даже до нижней границы физиологической нормы (у 30–50% в зависимости от сезона).

На основании проведенных исследований даны рекомендации по изменению качественного и количественного состава кормов и мер по поддержке обменных процессов у животных лекарственными средствами.

Литература

1. Алимов А.М., Сайфутдинов Р.Ф., Микрюкова Е.Ю. Влияние Стимулина на физиологическое состояние и

- резистентность сухостойных коров и телят // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана — 2017. — Т. 232. — № 24. — С. 5–8.
2. Алимов А.М. Достижения биотехнологии в борьбе с инфекционными болезнями животных // Ветеринарный врач. — 2005. — № 2. — С. 72–75.
 3. Алимов А.М., Алимов М.А., Сайфутдинов Р.Ф. Показатели естественной резистентности импортного молочного скота в новых условиях обитания // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана — 2018. — Т. 235. — № 3. — С. 4–6.
 4. Алимов А.М., Хазипов Н.Э., Якупов Т.Р., Логинов Г.П. Практикум по биохимии с основами физколлоидной химии. — Казань, 2012. — 236 с.
 5. Беклемишев Н.Д. Иммунопатология и иммунорегуляция (при инфекциях, инвазиях и аллергиях). — М.: «Медицина» — 1986. — 356 с.
 6. Боголюбова Н.В., Рыков Р.А. Метаболический статус организма быков-производителей разных генотипов // Архив. — 2020. — № 3 — С. 12–14.
 7. Гаврилов Ю.А., Гаврилова Г.А., Сокольникова Т.А. Адаптация коров австралийской популяции к природно-климатическим условиям Дальнего Востока и взаимосвязь процессов свободнорадикального окисления с накоплением аутоантител к некоторым органам пищеварения // Вестник Алтайского государственного аграрного университета — 2012. — № 10(36). — С. 83–86.
 8. Галактионов В.Г. Иммунология. 3-е изд., испр. и доп. — Москва: Академия, 2004. — 523 с.
 9. Григорьев В.С., Карамеев В.С. Естественная резистентность коров голштинской породы разных генераций // Ветеринарная медицина XXI века: инновации, опыт, проблемы и пути их решения. — Ульяновск: Ульяновская ГСХА, 2011. — Т. 2. — С. 171–174.
 10. Зарипов Р.У., Алимов А.М., Миннебаев И.Р. Состояние белкового, липидного обмена и резистентности быков-производителей голштинской породы // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. — 2022. — Т. 251. — № 1. — С. 120–123.
 11. Каналина Н.М., Валиуллина Д.А., Касанова Н.Р. Экономическая оценка разведения коров-первотёлок разных линий татарстанского типа // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. — 2019. — Т. 237. — № 1. — С. 86–89.
 12. Коровин А.В. Адаптационные и продуктивные особенности коров молочных пород в условиях промышленного комплекса: дис. канд. с.-х. наук. — Казань, 2015. — 294 с.
 13. Кузнецов В.М., Ревина Г.Б., Асташенкова Л.И. Уровень естественной резистентности и биохимический состав крови коров голштинской породы сахалинской популяции в зависимости от генетико-средового влияния // Международный научно-исследовательский журнал. — 2022. — № 9(51). — Ч. 3. — С. 121–123.
 14. Тлейнишева М.Г. Продуктивные особенности и резистентность голштинизированных коров в условиях отгонно-горного содержания Кабардино-Балкарской Республики: дис. канд. с.-х. наук. — Нальчик, 2005. — 127 с.
 15. Федоров Ю.Н. Иммунодефициты: диагностика и пути предотвращения // Ветеринария сельскохозяйственных животных — 2009. — № 3. — С. 4–8.
 16. Хайруллин, Д.Д., Шакиров Ш.К., Папунди Э.К., Крупин Е.О. Научно-практические аспекты коррекции витаминно-минерального питания жвачных животных. — Монография. Казань, 2020. — 172 с.
 17. Borshch O.O., Borshch O.V., Sobolev O.I. Hematological status of cows with different stress tolerance // Ukrainian Journal of Ecology. — 2021. — Vol. 11. — No. 7. — P. 14–21.
 18. Cozzi G., Ravarotto L., Gottardo F., Stefani A.L., Contiero B., Moro L., Brscic M., Dalvit P. Reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: effects of parity, stage of lactation, and season of production // Journal of Dairy Science. — 2011. — Vol. 94. — No. 8. — P. 3395–3901.
 19. Petrera F., Napolitano F., Dal Prà A., Abeni F. Plasma parameters related to energy and lipid metabolism in periparturient Modenese and Italian Friesian cows // Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition — 2014. — Vol. 99. — No. 5. — P. 962–973.
 20. Piccione G. Changes of some haematochemical parameters in dairy cows during late gestation, post partum, lactation and dry periods // Veterinaria ir Zootechnika — 2012. — Vol. 58. — No. 80. — P. 59–64.

References

1. Alimov AM, Sayfutdinov RF, Mikryukova YeYu. Vliyaniye Stimulina na fiziologicheskoye sostoyaniye i rezistentnost' sukhostoynykh korov i telyat. Uchenyye zapiski Kazanskooy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im NE Bauman 2017; 232(24):5–8 (in Russian).
2. Alimov AM. Dostizheniya biotekhnologii v bor'be s infektsionnymi boleznyami zhivotnykh. Veterinarnyy vrach 2005; 2:72–75 (in Russian).
3. Alimov AM, Alimov MA, Sayfutdinov RF. Pokazateli yestestvennoy rezistentnosti importirovannogo molochnogo skota v novykh usloviyakh obitaniya. Uchenyye zapiski Kazanskooy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im NE Bauman 2018; 235(3):4–6 (in Russian).
4. Alimov AM, Khazipov NZ, Yakupov TR, Loginov GP. Praktikum po biokhimii s osnovami fizkolloidnoy khimii. Kazan', 2012: 236 (in Russian).
5. Beklemishev ND. Immunopatologiya i immunoregulyatsiya (pri infektsiyakh, invazyakh i allergiyakh). Moscow: «Medit-sina 1986: 356 (in Russian).

6. Bogolyubova NV, Rykov RA. Metabolicheskiy status organizma bykov-proizvoditeley raznykh genotipov. *Arkhiv* 2020; 3:12–14 (in Russian).
7. Gavrilov YuA, Gavrilova GA, Sokol'nikova TA. Adaptatsiya korov avstraliyskoy populatsii k prirodno-klimaticheskim usloviyam Dal'nego Vostoka i vzaimosvyaz' protsessov svobodnoradikal'nogo okisleniya s nakopleniyem autoantitel k nekotorym organam pishchevareniya. *Vestnik Altayskogo gosudarstvennogo agrarnogo universitet* 2012; 10(36):83–86 (in Russian).
8. Galaktionov VG. *Immunologiya*. 3-e izd., ispr b dop. Moscow: Akademiya, 2004: 523 (in Russian).
9. Grigor'yev VS, Karamayev VS. Yestestvennaya rezistentnost' korov golshhtinskoy porody raznykh generatsiy. *Veterinarnaya meditsina XXI veka: innovatsii, opyt, problemy i puti ikh resheniya*. Ul'yanovsk: Ul'yanovskaya GSKHA, 2011; 2:171–174 (in Russian).
10. Zariyov RU, Alimov AM, Minnebayer IR. Sostoyaniye belkovogo, lipidnogo obmena i rezistentnosti bykov-proizvoditeley golshhtinskoy porody. *Uchenyye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im NE Baumana* 2022; 251(1):120–123 (in Russian).
11. Kanalina NM, Valiullina DA, Kasanova NR. Ekonomicheskaya otsenka razvedeniya korov-pervotolok raznykh liniy tatarstanskogo tipa. *Uchenyye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im NE Baumana* 2019; 237(1):86–89 (in Russian).
12. Korovin AV. Adaptatsionnyye i produktivnyye osobennosti korov molochnykh porod v usloviyakh promyshlennogo kompleksa: dis kand s-kh nauk. *Kazan'*, 2015: 294 (in Russian).
13. Kuznetsov VM, Revina GB, Astashenkova LI. Uroven' yestestvennoy rezistentnosti i biokhimicheskii sostav krovi korov golshhtinskoy porody sakhalinskoy populatsii v zavisimosti ot genetiko-sredovogo vliyaniya. *Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal* 2022; 9(51):. 3:121–123 (in Russian).
14. Tleynsheva MG. Produktivnyye osobennosti i rezistentnost' golshhtinizirovannykh korov v usloviyakh otgonno-gornogo soderzhaniya Kabardino-Balkarskoy Respubliki: dis kand s-kh nauk. *Nal'chik*, 2005: 127 (in Russian).
15. Fedorov YuN. Immunodefitsity: diagnostika i puti predotvrashcheniya. *Veterinariya sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh* 2009; 3:4–8 (in Russian).
16. Khayrullin, DD, Shakirov SHK, Papunidi EK, Krupin YeO. Nauchno-prakticheskiye aspekty korrektsii vitaminno-mineral'nogo pitaniya zhvachnykh zhivotnykh. *Monografiya*. *Kazan'*, 2020: 172 (in Russian).
17. Borshch OO, Borshch OV, Sobolev OI. Hematological status of cows with different stress tolerance. *Ukrainian Journal of Ecology* 2021; 11(7):14–21.
18. Cozzi G, Ravarotto L, Gottardo F, Stefani AL, Contiero B, Moro L, Brscic M, Dalvit P. Reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: effects of parity, stage of lactation, and season of production. *Journal of Dairy Science* 2011; 94(8):3395–3901.
19. Petreria F, Napolitano F, Dal Prà A, Abeni F. Plasma parameters related to energy and lipid metabolism in periparturient Modenese and Italian Friesian cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2014; 99(5):962–973.
20. Piccione G. Changes of some haematochemical parameters in dairy cows during late gestation, post partum, lactation and dry periods. *Veterinarija ir Zootehnik* 2012; 58(80):59–64.

BIOCHEMICAL ASPECTS OF EXCHANGE PROCESSES IN HOLSTEIN-BRED BULLS

R.U. ZARIPOV¹, A.M. ALIMOV¹, N.R. KASANOVA¹, F.R. ZARIPOV²

¹*Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, Kazan,*

²*Parent breeding enterprise «Elite», Kazan, Vysokogorsky district, village of Vysokaya Gora, Republic of Tatarstan*

The control of the state of metabolism and resistance is essential for ensuring the health and long-term productive use of producer bulls. Biochemical and immunological studies play an important role in this regard, which make it possible to establish the direction of metabolism and the functional state of the physiological systems of the animal body. The study presents the results of studying biochemical blood parameters of Holstein-breed bulls in different seasons of the year. It was possible to identify deviations in such important indicators of the state of the body as total protein, creatinine, bilirubin, liver enzyme activity (ALT, AST, ALP), triglyceride concentration, lipase and amylase activity, as well as mineral metabolism (potassium, phosphorus, sodium, magnesium, iron, etc.). The obtained data indicate a violation of protein, lipid, carbohydrate, mineral metabolism and, as a result, the need to correct metabolism in animals.

Keywords: blood biochemistry, oxen-producers, metabolism.

Address:

Kasanova N.R.

Candidate of agricultural sciences, associate professor
of the department of biochemistry, physics and mathematics
of the Kazan State Academy of Veterinary Medicine named
after N.E. Bauman

E-mail: nadia-kasanova@mail.ru

Для цитирования:

Зарипов Р.У., Алимов А.М., Касанова Н.Р., Зарипов Ф.Р. Биохимические аспекты обменных процессов у быков-производителей голштинской породы. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(2):13–20.

For citation:

Zaripov R.U., Alimov A.M., Kasanova N.R., Zaripov F.R. Biochemical aspects of exchange processes in Holstein-bred bulls. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(2): 13–20 (in Russian).

НЕЙРОСЕТЕВОЙ АНАЛИЗ БИОКОНСОЛИДАЦИИ БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС В ИССЛЕДОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

А.А. КУРИЛОВА^{1*}, И.И. КОЧИШ², О.О. БАБИЧ³, Н.И. ВОРОБЬЕВ⁴,
И.Н. НИКОНОВ², Л.Ю. КАРПЕНКО¹

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; ⁴ ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург

В данной статье представлены результаты расчета при помощи корреляционной нейронной сети биоконсолидации биохимических показателей сыворотки крови лабораторных животных в рамках исследования хронической токсичности новой кормовой добавки на основе экстрактов лекарственных растений Калининградской области. По итогам проведенного анализа установлено, что применение кормовой добавки приводило к увеличению концентрации альбуминов, мочевины, азота мочевины, билирубина, фосфора, активности аспаратаминотрансферазы, щелочной фосфатазы и уменьшению концентрации глюкозы, холестерина и кальция в сыворотке крови крыс-самцов. Также отмечалось, что животные, получавшие кормовую добавку в дозировке 1000 мг/кг, наиболее интенсивно набирали живую массу.

Ключевые слова: корреляционная нейронная сеть, экстракты лекарственных растений, хроническая токсичность, биохимия крови.

Введение

Экстракты лекарственных растений представляют собой перспективное сырье для разработки новых кормовых добавок для сельскохозяйственных животных: биологически активные вещества, входящие в состав растений, обладают антиоксидантным, противовоспалительным, противопаразитарным и антимикробным действием. Антимикробная активность наиболее характерна для терпеноидов (монотерпеноидов и сесквитерпеноидов) и фенилпропаноидов [16]. Кроме того, применение растительных кормовых добавок стимулирует аппетит, приводит к увеличению конверсии корма, набору живой массы, улучшает качество мяса животных. Увеличение конверсии питательных веществ корма объясняется, в частности, стимулирующим действием эфирных масел, входящих в состав лекарственных растений,

на секреторную активность поджелудочной железы [17]. У животных с многокамерным желудком растительные кормовые добавки стимулировали ферментацию в рубце, приводили к увеличению концентрации летучих жирных кислот, молярной доли пропионата [19]. Также отмечается подавление роста простейших и метаногенных бактерий в рубце, что приводит к снижению потерь энергии при выделении метана [19]. Биологически активные вещества, содержащиеся в лекарственных растениях, ингибируют развитие патогенной микрофлоры и способствуют развитию стимулирующей микрофлоры в организме сельскохозяйственных животных [16]. Положительное влияние экстрактов лекарственных растений проявляется в увеличении концентрации иммуноглобулина А у растущих ягнят [16]. Кроме того, отмечалось снижение при потреблении этих экстрактов концентрации простагландина Е2 у молочных коров, что модулировало их иммунный статус [15]. Для оценки эффективности и безопасности растительных кормовых добавок необходимо проведение по стандартным методикам специальных токсикологических исследований [7, 12]. Для статистической обработки большого объема (BigData) результатов токсикологических исследований и оценки эффективности растительных кормовых добавок

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

* **Автор для переписки:**

Курилова Анастасия Андреевна
соискатель кафедры биохимии и физиологии ФГБОУ ВО «СПБГУВМ»

E-mail: aakurilova95@yandex.ru

наилучшим образом подходят вычислительные процедуры корреляционной нейронной сети (КНС). Выходным параметром КНС является индекс биоконсолидации биохимических иммунных процессов в организме животных. При этом мы предполагаем, что увеличение величины индекса биоконсолидации сигнализирует о возрастании иммунного потенциала защитной системы животных. Вектор весовых коэффициентов КНС содержит информацию, которую можно использовать для сокращения объема токсикологических исследований, так как весовые коэффициенты для некоторых показателей крови животных могут иметь нулевое значение, а это означает, что соответствующий показатель крови не влияет на индекс биоконсолидации и может быть исключен из плана токсикологических исследований.

Целью настоящего исследования явилась разработка алгоритма вычислений искусственной корреляционной нейронной сети для определения зависимости биохимических показателей сыворотки крови лабораторных животных от токсичности различных дозировок растительных кормовых добавок на основе экстрактов лекарственных растений Калининградской области.

Материалы и методы

В исследованиях использовалась кормовая добавка, разработанная на базе Института живых систем ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта», в состав которой входили следующие экстракты лекарственных растений (мг/кг корма): растительные экстракты ладьяна трехнадрезанного (*Corallorhiza trifida*) – 15,0, лобки зеленоцветковой (*Platanthera chlorantha*) – 12,5, лобки двулистной (*P. bifolia*) – 12,5, лунника оживающего (*Lunaria rediviva*) – 9,0, синеголовника приморского (*Eryngium maritimum*) – 15,0, гудайеры ползучей (*Goodyera repens*) – 15,0. Исследования по определению хронической токсичности проводились в соответствии с рекомендациями «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [4]. Опыты на лабораторных животных соответствовали этическим соображениям согласно Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 года) [8].

Для проведения исследования использовали белых крыс-самцов (линия Уистар) 2-месячного возраста, которые были приобретены в Федеральном государственном унитарном предприятии «Питомник лабораторных животных «РАППОЛОВО». Средняя живая масса животных составляла 160 г. Всего в эксперименте было

задействовано 40 животных. Перед началом исследования крыс-самцов выдерживали на карантине в течение 7 суток в отдельном помещении с ежедневным клиническим осмотром. Для проведения исследования было сформировано 4 группы животных по 10 голов в каждой по принципу пар-аналогов. Кормовую добавку задавали животным трех подопытных групп внутрижелудочно с помощью шприца и иглы с булавовидным утолщением на конце в дозировках 100, 1000 и 5000 мг/кг, что соответствовало 16, 160, 800 мг на животное. Контрольным веществом, которым выпаивали крыс-самцов четвертой группы в тех же дозировках, как и кормовая добавка подопытным, была дистиллированная вода. На протяжении эксперимента проводили взвешивание животных на лабораторных весах M-ER 122ACF-3000.1 LCD «Accurate» (Mercury WP Tech Group Co., Ltd., Корея). На 180-е сутки с момента начала исследования проводили забор крови общепринятыми в ветеринарии методиками при помощи вакуумных пробирок Improvacuter, Guangzhou Improve Medical Instruments, Китай). Морфологический анализ крови животных проводили на автоматическом гематологическом анализаторе ABX Micros 60 (Horiba, Франция). Исследование биохимических показателей проводили на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Clima MC-15 (компания RAL, Испания).

Алгоритм корреляционной нейронной сети

Для вычисления индексов иммунной биоконсолидации биохимических показателей крови крыс была использована корреляционная нейронная сеть (КНС, рис. 1) [2, 3, 5, 6].

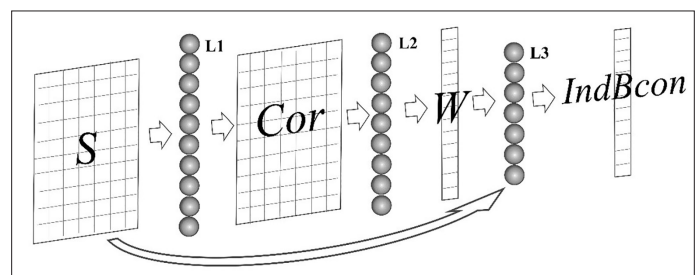


Рис. 1. Искусственная корреляционная нейронная сеть, вычисляющая индексы биоконсолидации по биохимическим показателям сыворотки крови крыс. S – матрица биохимических показателей сыворотки крови крыс по вариантам опыта. Cor – матрица парных корреляций биохимических показателей. W – вектор весовых коэффициентов биохимических показателей. IndBcon – вектор индексов биоконсолидации биохимических процессов в организме крыс. L1, L2, L3 – слои нейронов, выполняющие математические преобразовательные операции с числовыми данными.

Вычисления в КНС происходят слева направо. При этом результаты вычислений в предыдущем слое искусственных нейронов используются для вычислений в последующих слоях. В слое нейронов L1 (см. рис. 1) вычисляется матрица Cor парных коэффициентов корреляции биохимических показателей сыворотки крови крыс по формуле (1) [1].

$$Cor_{l,k} = Abs[CoefficientCorrelation(\{S_{l,1}, S_{l,2}, S_{l,3}, S_{l,4}\}; \{S_{k,1}, S_{k,2}, S_{k,3}, S_{k,4}\})], (1)$$

где $S_{l...}, S_{k...}$ — значения биохимических показателей с порядковыми номерами $k, l = 1, 2, \dots, M=17$ — порядковые номера измеряемых показателей крови (табл. 1); $CoefficientCorrelation(), Abs()$ — функции, вычисляющие коэффициент корреляции и абсолютную величину чисел.

Далее в слое нейронов L2 (см. рис. 1) вычисляется вектор весовых коэффициентов W для биохимических показателей по формулам (2).

$$W_k = \frac{1}{d} \cdot \left(\sum_{l=1}^{l=M} Cor_{l,k} - m \right), (2)$$

$$m = \frac{1}{M} \sum_{k=1}^{k=M} \left(\sum_{l=1}^{l=M} Cor_{l,k} \right);$$

$$d = \sqrt{\sum_{k=1}^{k=M} \left(\sum_{l=1}^{l=M} Cor_{l,k} - m \right)^2};$$

$l, k = 1, 2, \dots, M=17$ — порядковые номера биохимических показателей.

Далее в слое нейронов L3 (см. рис. 1) вычисляются индексы биоконсолидации ($IndBcon$) по формуле матричного произведения (3) и формуле (4).

$$P = W^T \times G, (3)$$

где $G_{l,k} = (S_{l,k} - m_k) / d_k$; — матрица преобразованных исходных данных;

$$m_k = \frac{1}{M} \cdot \sum_{l=1}^{l=M} S_{l,k}; \quad d_k = \sqrt{\sum_{l=1}^{l=M} (S_{l,k} - m_k)^2};$$

$l = 1, 2, \dots, M=17$ — порядковые номера показателей крови; $k = 1, 2, 3, 4$ — порядковые номера вариантов опыта; W^T — транспонированный в строку вектор весовых коэффициентов показателей крови; $P = \{P_1, P_2, P_3, P_4\}$ — вектор данных промежуточных вычислений.

Используя вектор P , вычисляется вектор коэффициентов биоконсолидации $IndBcon_k$ биохимических процессов в организме крыс по вариантам опыта (формула 4).

$$IndBcon_k = [1 + \exp(-P_k)]^{-1}, (4)$$

где $k = 1, 2, 3, N=4$ — порядковые номера вариантов опыта.

Результаты и обсуждение

В результате измерений и вычислений КНС получены данные о значениях весовых коэффициентов вектора W (табл. 1) и значения индекса биоконсолидации $IndBcon$ (табл. 2). Кроме этого, в таблице 2 приведены коэффициенты корреляции $IndBcon$ с массой крыс.

Таблица 1

Влияние биологически активной добавки из экстрактов растений Калининградской области на биохимические показатели сыворотки крови крыс на 180-е сутки эксперимента ($M \pm m; n=10$)

Показатель	Дозировка, мг/кг в сутки			Контроль	Весовой коэффициент W
	100,0	1000,0	5000,0		
1 Общий белок, г/л	69,41±3,13	72,76±3,21	67,81±3,14	70,80±3,03	0
2 Альбумины, г/л	25,25±0,46	23,67±0,81	23,99±0,68	25,13±0,68	0,38±0,02
3 Глобулины, г/л	42,37±3,04	46,84±2,99	42,92±3,46	45,91±1,39	0
4 Альбумины, %	36,33±2,34	32,92±0,87	34,71±2,41	34,59±1,87	0,31±0,02
5 Глобулины, %	63,67±2,51	68,11±0,93	66,40±2,13	65,55±1,78	0,39±0,02
6 Мочевина, ммоль/л	6,44±0,70	7,67±0,61	7,03±0,81	6,89±0,37	0,38±0,02
7 Азот мочевины, моль/л	3,13±0,24	3,76±0,19	3,59±0,19	3,28±0,34	0,40±0,02
8 Креатинин, мкмоль/л	46,93±1,21	47,42±1,23	46,11±1,12	45,71±1,32	0
9 Билирубин, мкмоль/л	3,03±0,45	4,44±0,87	3,89±1,18	4,13±0,78	0,21±0,02
10 АЛТ, МЕ/л	86,13±8,66	90,18±9,78	87,12±8,24	75,66±10,28	0
11 АСТ, МЕ/л	237,11±24,22	239,71±30,51	238,13±34,20	236,00±38,60	0,30±0,02
12 Щелочная фосфатаза, МЕ/л	181,41±30,22	218,52±32,72	219,13±41,13	157,52±21,33	0,20±0,02
13 Амилаза, МЕ/л	4017,22±289,01	4224,11±356,03	4414,07±500,08	3987,00±604,03	0,11±0,02
14 Глюкоза, ммоль/л	10,24±0,71	9,78±0,75	9,78±0,66	8,85±0,34	-0,20±0,02
15 Холестерин, ммоль/л	1,47±0,14	1,49±0,08	1,37±0,07	1,49±0,11	-0,24±0,02
16 Кальций, ммоль/л	2,37±0,05	2,46±0,04	2,51±0,07	2,58±0,06	-0,12±0,02
17 Фосфор, ммоль/л	2,22±0,19	2,31±0,21	2,18±0,19	2,17±0,16	0,09±0,02

Таблица 2

**Динамика прироста массы тела у крыс при пероральном введении биологически активной добавки из экстрактов растений Калининградской области в течение шести месяцев ($M \pm m$; $n=10$).
Индекс биоконсолидации (IndVcon) и коэффициенты корреляции масс крыс с IndVcon**

Период	Дозировка, мг/кг в сутки			Контроль	Коэфф. корреляции с IndVcon, r
	100,0	1000,0	5000,0		
В начале опыта	156,50±4,11	161,90±4,41	158,22±3,73	157,16±4,63	0,87
4 недели	261,82±7,31	277,82±8,23	266,14±7,62	264,51±7,23	0,83
8 недель	307,62±8,30	332,81±8,20	315,91±9,13	314,14±10,23	0,84
12 недель	351,80±9,13	366,90±9,92	360,31±10,13	359,12±10,64	0,88
16 недель	412,63±7,32	427,90±6,00	420,81±6,82	416,31±6,83	0,95
20 недель	467,11±7,12	483,43±7,10	475,21±3,64	471,22±4,53	0,93
24 недели	492,32±7,20	504,32±7,11	496,32±6,24	493,14±6,12	0,88
IndVcon	0,32±0,02	0,68±0,02	0,61±0,02	0,39±0,02	-

При анализе расчетных данных в таблице 1 отмечено, что биоконсолидация биохимических процессов в организме крыс: негативно зависит от значений биохимических показателей глюкозы, холестерина и кальция сыворотки крови крыс (отрицательные значения весовых коэффициентов вектора W); позитивно зависит от концентрации альбуминов, мочевины, азота мочевины, билирубина, фосфора, активности аспаратаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, амилазы (положительные значения весовых коэффициентов вектора W) и не зависит от концентрации общего белка, креатинина и активности аланинаминотрансферазы (нулевые значения весовых коэффициентов вектора W). Следовательно, последние показатели крови крыс могут быть исключены из токсикологических исследований крыс.

Применение кормовой добавки на основе экстрактов лекарственных растений предположительно приводило к индукции транслокации инсулин-зависимого белка-переносчика GLUT4 в плазматические мембраны, что, в свою очередь, приводило к снижению уровня глюкозы в сыворотке крови лабораторных животных [9]. Снижение концентрации холестерина может быть обусловлено тем, что полисахариды, содержащиеся в лекарственных растениях, препятствуют всасыванию холестерина в кишечнике [14]. Также предполагается, что уроновые кислоты полисахаридов способны захватывать холестерин [13]. Увеличение концентрации альбуминов, мочевины, азота мочевины, билирубина, фосфора, активности аспаратаминотрансферазы, щелочной фосфатазы может быть обусловлено стимулирующим влиянием на функциональную активность печени животных [20]. Увеличение активности амилазы может быть связано с тем, что фенольные соединения растений стимулируют синтез пищеварительных ферментов поджелудочной железы на уровне экспрессии генов [11].

Преобразование исходных показателей крови крыс вычислениями в КНС в индексы иммунной биоконсолидации биохимических процессов в организме крыс позволило выявить различия в вариантах опыта, связанные с разным потреблением крысами растительных добавок. При этом корреляция индекса IndVcon с биомассой крыс ($r=0,83...0,95$) доказывает, что имеется зависимость биохимических иммунных процессов в организмах крыс от рациона их кормления. По результатам исследования было установлено, что дозировка 1000,00 мг/кг приводит к наибольшей биоконсолидации иммунных биохимических процессов в организме крыс.

Заключение

Введение кормовой добавки оказывало влияние на биохимические иммунные процессы в организмах крыс-самцов подопытных групп: снижалась концентрация глюкозы, холестерина и кальция, увеличивалась концентрация альбуминов, мочевины, азота мочевины, билирубина, фосфора, активности аспаратаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, амилазы. При наблюдении за подопытными животными на протяжении 24 недель был отмечен наиболее интенсивный набор живой массы у 2-й группы подопытных животных.

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

Литература

1. Воробьев Н.И., Свиридова О.В., Попов А.А., Русакова И.В., Петров В.Б. Граф-анализ генно-метаболических сетей микроорганизмов, трансформирующих растительные

- остатки в гумусовые вещества // Сельскохозяйственная биология. — 2011. — № 3. — С. 88–93.
2. Гафаров Ф.М., Галимянов А.Ф. Искусственные нейронные сети и приложения: учеб. пособие. — Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2018. — 121 с.
 3. Минский М., Пейперт С. Персептроны. — М.: Изд-во «Мир», 1971. — 264 с.
 4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая (под ред. А.Н. Миронова). — М.: ГрифиК, 2012. — 944 с.
 5. Сергеев А.П., Тарасов Д.А. Введение в нейросетевое моделирование: учеб. Пособие. — Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2017. — 128 с.
 6. Хливненко Л.В. Практика нейросетевого моделирования. — Воронеж: ФГБОУ ВО «Воронежский государственный технический университет», 2015. — 214 с.
 7. 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.
 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. Haselgrübler R., Stadlbauer V., Stübl F., Schwarzinger B. et al. Insulin mimetic properties of extracts prepared from *Bellis perennis* // Molecules. — 2018. — Vol. 10. — No. 23. — P. 2605. doi: 10.3390/molecules23102605.
 10. Lan W., Yang C. Ruminant methane production: associated microorganisms and the potential of applying hydrogen utilizing bacteria for mitigation // Science of the total environment. — 2019. — Vol. 654. — P. 1270–1283.
 11. Lee H.L., Park J.W., Seo E.S., Kim H.U., Kim S.W. et al. Functional efficacy of *Angelica gigas* Nakai on chicken myoblast cells through cell-based in vitro // Animal Science Journal. — 2019. — Vol. 90. — No. 7. — P. 903–912.
 12. Manuelian C.L. et al. Plant feed additives as natural alternatives to the use of synthetic antioxidant vitamins on livestock mammals' performances, health, and oxidative status: A review of the literature in the last 20 years // Antioxidants. — 2021. — Vol. 10. — No. 9. — P. 757. doi: 10.3390/antiox10091461.
 13. Pau-Roblot C., Courtois B., Courtois J. Interactions between polysaccharides uronic acid sequences and lipid molecules // Comptes Rendus Chimie. — 2010. — Vol. 13. — No. 4. — P. 443–448.
 14. Pereira M.A., Ludwig D.S. Dietary fiber and body-weight regulation. Observations and mechanisms // Pediatric Clinics of North America. — 2001. — Vol. 48. — No. 4. — P. 969–980.
 15. Qiao C., Shao T., Yang X., Zhu X. et al. Effects of supplemental Chinese herbs on growth performance, blood antioxidant function and immunity status in Holstein dairy heifers fed high fibre diet // Italian Journal of animal Science. — 2013. — Vol. 12. — P. 116–120.
 16. Qiao J., Li H.H., Zheng C.J., Feng Z.Y., Wang W. Dietary supplementation with *Aloe vera* polysaccharide enhances the growth performance and immune function of weaned piglets // Journal of animal feed sciences. — 2013. — Vol. 22. — P. 329–334.
 17. Ren L., Junjie L., Xiao Y., Zhang Y., Fan J. et al. Polysaccharide from *Lycium barbarum* L. leaves enhances absorption of endogenous calcium, and elevates cecal calcium transport protein levels and serum cytokine levels in rats // Journal of functional foods. — 2017. — Vol. 33. — P. 227–234.
 18. Váradyová Z., Mravčáková D., Babijak M., Bryszak M. et al. Effects of herbal nutraceuticals and/or zinc against *Haemonchus contortus* in lambs experimentally infected // BMC Veterinary Research. — 2018. — Vol. 1. — No. 14. — P. 78. doi: 10.1186/s12917-018-1405-4.
 19. Wang X.J., Ding L.M., Wei H.Y., Jiang C.X. et al. Astragalus membranaceus root supplementation improves average daily gain, rumen fermentation, serum immunity and antioxidant indices of Tibetan sheep // Animal. — 2021. — Vol. 15. — P. 100061. doi: 10.1016/j.animal.2020.100061.
 20. Xie Z., Zhang J., Ma S., Huang X., Huang Y. Effect of Chinese herbal medicine treatment on plasma lipid profile and hepatic lipid metabolism in Hetian broiler // Poultry Science. — 2017. — Vol. 96. — No. 6. — P. 1918–1924.

References

1. Vorob'yev NI, Sviridova OV, Popov AA, Rusakova IV, Petrov VB. Graf-analiz genno-metabolicheskikh setey mikroorganizmov, transformiruyushchikh rastitel'nyye ostatki v gumusovyye veshchestva. Sel'skokhozyaystvennaya biologiya 2011; 3:88–93 (in Russian).
2. Gafarov FM, Galimyanov AF. Iskusstvennyye neyronnyye seti i prilozheniya: ucheb posobiye. Kazan': Izd-vo Kazan. un-ta, 2018: 121 (in Russian).
3. Minskiy M, Peypert S. Perseptrony. Moscow: Izd-vo «Mir», 1971: 264 (in Russian).
4. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya (pod red AN Mironova). Moscow: GrifiK, 2012: 944 (in Russian).
5. Sergeev AP, Tarasov DA. Vvedeniye v neyrosetevoye modelirovaniye: ucheb. Posobiye. Yekaterinburg: Izd-vo Ural. un-ta, 2017: 128 (in Russian).
6. Khlivnenko LV. Praktika neyrosetevogo modelirovaniya. Voronezh: FGBOU VO «Voronezhskiy gosudarstvennyy tekhnicheskyy universitet», 2015: 214 (in Russian).
7. 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.

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. Haselgrübler R, Stadlbauer V, Stübl F, Schwarzinger B et al. Insulin mimetic properties of extracts prepared from *Bel-lis perennis*. *Molecules* 2018; 10(23):2605. doi: 10.3390/molecules23102605.
10. Lan W, Yang C. Ruminant methane production: associated microorganisms and the potential of applying hydrogen utilizing bacteria for mitigation. *Science of the total environment* 2019; 654:1270–1283.
11. Lee HL, Park JW, Seo ES, Kim HU, Kim SW et al. Functional efficacy of *Angelica gigas* Nakai on chicken myoblast cells through cell-based in vitro. *Animal Science Journal* 2019; 90(7):903–912.
12. Manuelian CL et al. Plant feed additives as natural alternatives to the use of synthetic antioxidant vitamins on livestock mammals' performances, health, and oxidative status: A review of the literature in the last 20 years. *Antioxidants* 2021; 10(9):757. doi: 10.3390/antiox10091461.
13. Pau-Roblot C, Courtois B, Courtois J. Interactions between polysaccharides uronic acid sequences and lipid molecules. *Comptes Rendus Chimie* 2010; 13(4):443–448.
14. Pereira MA, Ludwig DS. Dietary fiber and body-weight regulation. Observations and mechanisms. *Pediatric Clinics of North America* 2001; 48(4):969–980.
15. Qiao C, Shao T, Yang X, Zhu X et al. Effects of supplemental Chinese herbs on growth performance, blood antioxidant function and immunity status in Holstein dairy heifers fed high fibre diet. *Italian Journal of animal Science* 2013; 12:116–120.
16. Qiao J, Li HH, Zheng CJ, Feng ZY, Wang W. Dietary supplementation with *Aloe vera* polysaccharide enhances the growth performance and immune function of weaned piglets. *Journal of animal feed sciences* 2013; 22:329–334.
17. Ren L, Junjie L, Xiao Y, Zhang Y, Fan J et al. Polysaccharide from *Lycium barbarum* L. leaves enhances absorption of endogenous calcium, and elevates cecal calcium transport protein levels and serum cytokine levels in rats. *Journal of functional foods* 2017; 33:227–234.
18. Váradyová Z, Mravčáková D, Babijak M, Bryszak M et al. Effects of herbal nutraceuticals and/or zinc against *Haemonchus contortus* in lambs experimentally infected. *BMC Veterinary Research* 2018; 1(14):78. doi: 10.1186/s12917-018-1405-4.
19. Wang XJ, Ding LM, Wei HY, Jiang CX et al. *Astragalus membranaceus* root supplementation improves average daily gain, rumen fermentation, serum immunity and antioxidant indices of Tibetan sheep. *Animal* 2021; 15: 100061. doi: 10.1016/j.animal.2020.100061.
20. Xie Z, Zhang J, Ma S, Huang X, Huang Y. Effect of Chinese herbal medicine treatment on plasma lipid profile and hepatic lipid metabolism in Hetian broiler. *Poultry Science* 2017; 96(6):1918–1924.

NEURAL NETWORK ANALYSIS OF BIOCONSOLIDATION OF BIOCHEMICAL PARAMETERS OF RAT BLOOD SERUM IN THE STUDY OF CHRONIC TOXICITY OF A FEED ADDITIVE BASED ON MEDICINAL PLANTS EXTRACTS

A.A. KURILOVA¹, I.I. KOCHISH², O.O. BABICH³, N.I. VOROBYOV⁴,
I.N. NIKONOV², L.Yu. KARPENKO¹

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

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

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

⁴ *All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology, Saint Petersburg*

The article introduces the results of the analysis of bioconsolidation of laboratory animals' serum parameters during the exploration of studying chronic toxicity of the new feed additive based on herbal extracts using the correlation neural network. It was found that the usage of the new feed additive led to increasing of serum concentration of albumin, urea, urea nitrogen, bilirubin, phosphorus, aspartate aminotransferase activity, alkaline phosphatase and decreasing of concentrations of glucose, cholesterol and calcium. It was also shown that the animals which were given the feed additive in concentration of 1000 mg/kg were extremely gaining a living mass.

Keywords: correlation neural network, extracts of medicinal plants, chronic toxicity, blood biochemistry.

Address:

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

Для цитирования:

Курилова А.А., Кочиш И.И., Бабич О.О., Воробьев Н.И., Никонов И.Н., Карпенко Л.Ю. Нейросетевой анализ биоконсолидации биохимических параметров сыворотки крови крыс в исследовании хронической токсичности кормовой добавки на основе экстрактов лекарственных растений. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(2):21–27.

For citation:

Kurilova A.A., Kochish I.I., Babich O.O., Vorobyov N.I., Nikonov I.N., Karpenko L.Yu. Neural network analysis of bioconsolidation of biochemical parameters of rat blood serum in the study of chronic toxicity of a feed additive based on medicinal plants extracts. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(2):21–27 (in Russian).

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ДРОЖЖЕЙ МЕСТНОЙ СЕЛЕКЦИИ И РАЗЛИЧНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ВЫХОД СПИРТА ИЗ ПШЕНИЦЫ

Н.Ф. БИРАГОВА*, Н.А. ТИНИКАШВИЛИ

ФГБОУ ВО «Северо-Кавказский горно-металлургический институт (государственный технологический университет)», Владикавказ

Изучено влияние дрожжей местной селекции — штамм *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ У-3415 и штамм дрожжей *Metschnikowia pulcherrima* ВКПМ - У-3151 — и различных ферментных препаратов на активность амилазы и протеазы пшеницы. Установлено действие биокатализа пшеницы под действием комплексов ферментных препаратов в сочетании с новой расой дрожжей в процессе водно-тепловой обработки пшеницы. Выявлена зависимость между активацией ферментов и интенсификацией процесса брожения со снижением содержания летучих примесей в браге.

Ключевые слова: спирт, ферментные препараты, расы дрожжей.

Введение

На протяжении последних пяти лет наблюдается подъем производства спирта этилового, что обусловлено высоким спросом как со стороны алкогольной промышленности, так и со стороны производителей антисептических средств на фоне пандемии коронавируса. Одно из ведущих мест по производству этилового спирта занимает Республика Северная Осетия — Алания. Экспорт из Северной Осетии — Алании товаров из группы «напитки алкогольные и безалкогольные» за период апрель, 2020 — март, 2021 составил \$12,1 млн., общим весом 14 тыс. тонн. В основном экспортировался «спирт этиловый с концентрацией более 80%» (84%).

Среди приоритетных направлений в спиртовой промышленности в Республике Северная Осетия — Алания развивается направление, которое посвящено совершенствованию технологий производства спирта, основанных на подготовке сырья к сбраживанию с использованием усовершенствованных схем его переработки, а также с применением ферментных препаратов, влияющих на ферментативный гидролиз крахмалсодержащего сырья. На спиртовых заводах Республики Северная Осетия — Алания используют в основном непрерывную схему

разваривания сырья. Однако данный способ не позволяет использовать собственный ферментный комплекс сырья. Для этого необходимо применять ферментные препараты, которые представляют собой специфические катализаторы белковой природы. Их получают путем микробиологического синтеза при глубинном способе культивирования [1–5].

Ферментные препараты, по сравнению с солодом, имеют ряд значительных преимуществ, которые обуславливают их широкое применение. Так, для их производства используется более дешевое сырье. Гидролиз крахмала под их действием происходит полнее, что позволяет увеличивать выход спирта. Эти препараты имеют высокую активность и долгий срок хранения. Кроме того, использование ферментов микробного происхождения в высоких концентрациях дает возможность значительно ускорить процесс осахаривания сырья и сбраживания суслу.

Целью настоящей работы является разработка технологии ферментативного гидролиза крахмалсодержащего сырья (пшеницы) с применением ферментных препаратов. Было исследовано влияние дрожжей местной селекции и различных ферментных препаратов на активность амилазы и протеазы пшеницы.

Материалы и методы

В данном исследовании использовали следующие ферментные препараты: Глюкаваморин Гх-466; Амило-мезентерин Гх-467. Глюкаваморин ГЗх-466 — порошок от светло-желтого до светло-коричневого цвета. Особен-

© 2023 г. Бирагова Н.Ф., Тиникашвили Н.А.

* Автор для переписки:

Бирагова Нателла Фёдоровна

д.т.н., профессор кафедры «Химия и промышленная биотехнология» СКГМИ (ГТУ)

E-mail: biragova-nf@mail.ru

ностью Глюкавамарина Гх-466 является то, что он весьма стоек в кислой среде и способен сохранять высокую активность даже при рН 3,0–3,5. Оптимальные условия его действия: рН 4,0–5,5, температура 50–60 °С.

Особенностью Амиломезентерина Гх-467 является его термостойкость: он сохраняет высокую амилалитическую активность при температуре 75 °С. Оптимальные условия действия: рН 5,5–6,5, температура 50 °С. В настоящее время ведутся поиски новых, еще более активных продуцентов ферментов.

В эксперименте использовали дрожжи местной селекции: штамм *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ У-3415 и штамм дрожжей *Metschnikowia pulcherrima* ВКПМ - У-3151. Штамм *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ У-3415 обладает высокой продуктивностью, антагонистичен к сопутствующей микрофлоре, не является зоо- и фитопатогенным, не представляет опасности по другим причинам. Местный штамм дрожжей *Metschnikowia pulcherrima* (ВР) выделен в естественных условиях с поверхности винограда и культивируется на растительной питательной среде из зеленой массы горца сахалинского (*Reynoutria sachalinensis*).

Для эксперимента было взято 7 одинаковых образцов, в каждый из которых вносилось различное количество ферментных препаратов. В свою очередь, каждый из семи образцов делился на две равные части: в первую вносились дрожжи рода *Saccharomyces cerevisiae* У-3415, а во вторую — дрожжи расы У-3151.

Результаты

По итогам оценки всех семи образцов были построены графики зависимости концентрации спирта в браге от начальной видимой концентрации сухих веществ при разной дозировке ферментных препаратов и для определенных рас дрожжей.

Значение начальной концентрации сухих веществ, показанных на рисунках, соответствует следующему количеству задаваемых ферментных препаратов:

Концентрация сухих веществ, %	Ферментный препарат Глюкавамарин Гх-466	Ферментный препарат Амиломезентерин Гх-467
12,1	2,82	2,7
12,2	2,9	2,7
12,3	3,3	3,02
12,6	2,86	2,68
13	3,26	3,02
13,4	2,68	2,48
13,6	3,65	3,4

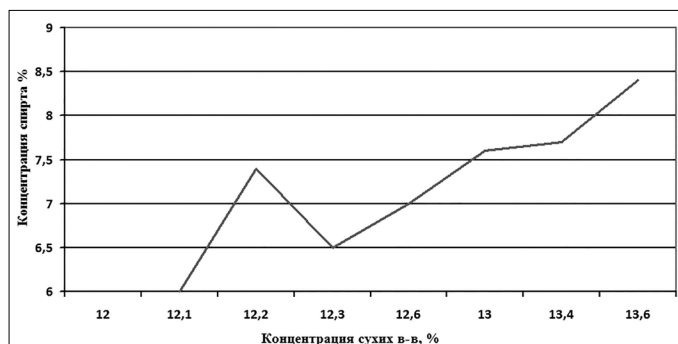


Рис. 1. Зависимость концентрации спирта в браге от начальной видимой концентрации сухих веществ, при разной дозировке комплекса ферментных препаратов, с использованием дрожжей расы *Saccharomyces cerevisiae* У-3415

Из рисунка 1 видно, что оптимальным вариантом является образец № 2, при видимой концентрации сухих веществ равной 13,6, с использованием комплекса ферментов Глюкавамарин Гх-466 — 3,65, Амиломезентерин Гх-467 — 3,4 и расы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* У-3415. Концентрация спирта наиболее высокая и равна 8,4%.

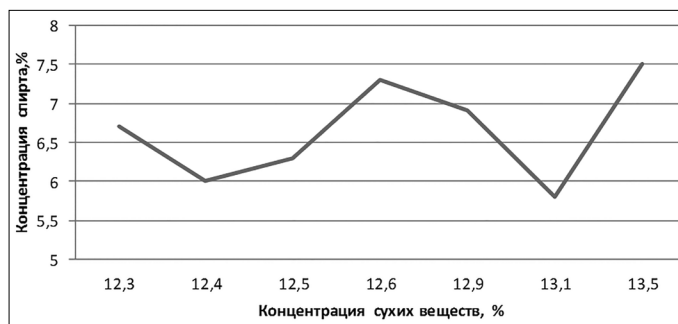


Рис. 2. Зависимость концентрации спирта в браге, от начальной видимой концентрации сухих веществ, при разной дозировке комплекса ферментных препаратов с использованием дрожжей расы *Metschnikowia pulcherrima* У-3151

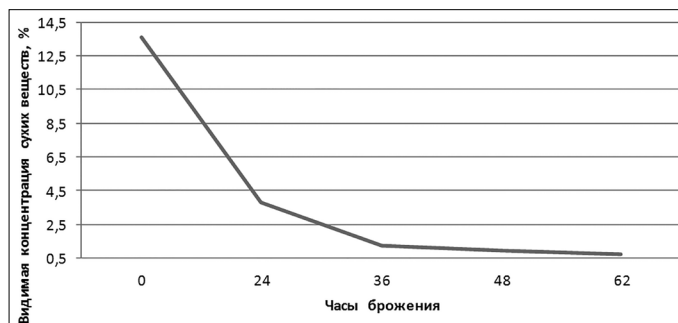


Рис. 3. Зависимость концентрации сухих веществ от длительности брожения (в часах)

Рисунок 2 отражает зависимость концентрации спирта от разных доз комплекса ферментных препаратов при использовании штамма дрожжей *Metschnikowia pulcherrima* ВКПМ - У-3151.

На рисунке 3 представлена зависимость концентрации сухих веществ от продолжительности брожения для образца № 2.

Заключение

Согласно результатам проведенного эксперимента было установлено, что оптимальным вариантом является образец № 2 с использованием ферментного комплекса: Глюкаваморин Гх-466 и Амиломезентерин Гх-467 (в соотношении 3,65:3,4) и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ У-3415. При сбраживании суслу, полученного с использованием указанного ферментного комплекса, процесс брожения сократился на 10 ч, а выход спирта увеличился на 0,1 декалитра условного крахмала.

Литература

1. Бирагова Н.Ф., Тиникашвили Н.А., Бирагов Д.А. Влияние полиферментных систем на выход спирта / Материалы XIII Всероссийской с международным участием конференции «Экологическая безопасность и сохранение генетических ресурсов растений и животных России и сопредельных территорий», посвященной 100-летию СОГУ, 19–21 мая 2021 г. — С. 326–331.
2. Бирагова Н.Ф., Тиникашвили Н.А., Гацунаева М.М. Усовершенствование технологии получения этанола с использованием новой расы дрожжей / Сб. научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции. — Москва, 2013 г. — С. 114–117.
3. Бирагова Н.Ф., Бирагова С.Р., Гацунаева М.М., Елияури Р.Р. Влияние ферментных препаратов на качество процесса осахаривания крахмалсодержащего сырья // Производство спирта и ликероводочных изделий. — 2010. — № 1. — С. 32–33.

4. Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. 3-е изд., перераб. и доп. — М.: Изд-во «Элеввар», 2000. — 512 с.
5. Петрукович А.Г., Хозиёв А.М. Получение этилового спирта дрожжами местной селекции *Metschnikowia pulcherrima* / Перспективы развития АПК в современных условиях: Материалы 9-й Международной научно-практической конференции, Владикавказ, 20–24 апреля 2020 года. — Владикавказ: Горский государственный аграрный университет, 2020. — С. 423–424.

References

1. Biragova NF, Tinikashvili NA, Biragov DA. Vliyaniye polifermentnykh sistem na vykhod spirita. Materialy XIII Vserossiyskoy s mezhdunarodnym uchastiyem konferentsii «Ekologicheskaya bezopasnost' i sokhraneniye geneticheskikh resursov rasteniy i zhivotnykh Rossii i sopredel'nykh territoriy», posvyashchennoy 100-letiyu SOGU, 19–21 maya 2021 g: 326–331 (in Russian).
2. Biragova NF, Tinikashvili NA, Gatsunayeva MM. Usovershenstvovaniye tekhnologii polucheniya etanola s ispol'zovaniyem novoy rasy drozhzhey. Sb nauchnykh trudov po materialam Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. Moskva, 2013 g: 114–117 (in Russian).
3. Biragova NF, Biragova SR, Gatsunayeva M M, Yeliauri RR. Vliyaniye fermentnykh preparatov na kachestvo protsessa osakharivaniya krakhmalsoderzhashchego syr'ya. Proizvodstvo spirita i likerovodochnykh izdeliy 2010; 1:32–33 (in Russian).
4. Gracheva IM, Krivova AYU. Tekhnologiya fermentnykh preparatov. 3-ye izd, pererab i dop. Moscow: Izd-vo «Elevar», 2000: 512 (in Russian).
5. Petrukovich AG, Khoziyev AM. Polucheniye etilovogo spirita drozhzhami mestnoy seleksii Metschnikovia pulcherrima. Perspektivy razvitiya APK v sovremennykh usloviyakh: Materialy 9-y Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, Vladikavkaz, 20–24 aprelya 2020 goda. Vladikavkaz: Gorskiy gosudarstvennyy agrarnyy universitet, 2020: 423–424 (in Russian).

STUDY OF THE INFLUENCE OF LOCAL SELECTION YEAST AND VARIOUS ENZYME PREPARATIONS ON THE YIELD OF ALCOHOL FROM WHEAT

N.F. BIRAGOVA, N.A. TINIKASHVILI

North Caucasian Mining and Metallurgical Institute (State Technological University), Vladikavkaz

The effect of locally bred yeasts, the *Saccharomyces cerevisiae* strain VKPM U-3415 and the yeast strain *Metschnikowia pulcherrima* VKPM U-3151, and various enzyme preparations on the activity of wheat amylase and protease was studied. The effect

of wheat biocatalysis under the action of complexes of enzyme preparations in combination with a new yeast race in the process of water-heat treatment of wheat has been established. The relationship between the activation of enzymes and the intensification of the fermentation process with a decrease in the content of volatile impurities in the mash was revealed.

Keywords: alcohol, enzyme preparations, yeast races.

Address:

Biragova N.F.

Doctor of technical sciences, professor of the department
of chemistry and industrial biotechnology, North Caucasian
Mining and Metallurgical Institute (State Technological
University), Vladikavkaz
E-mail: biragova-nf@mail.ru

Для цитирования:

Бирагова Н.Ф., Тиникашвили Н.А. Изучение влияния дрожжей местной селекции и различных ферментных препаратов на выход спирта из пшеницы. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(2):28–31.

For citation:

Biragova N.F., Tinikashvili N.A. Study of the influence of local selection yeast and various enzyme preparations on the yield of alcohol from wheat. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(2):28–31 (in Russian).

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК РЕЦЕПТОРНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ МЕДИАТОРА ФЕРРОЦЕНА И БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS PUTIDA* BS394 (pBS216) И *RHODOCOCCLUS PYRIDINIVORANS* 5AP ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНОЛЬНОГО ИНДЕКСА ПРИРОДНЫХ ВОД

Р.Н. ПЕРЧИКОВ*, А.С. ХАРЬКОВА, В.А. АРЛЯПОВ

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула

Исследованы физико-химические характеристики биосенсора на основе микроорганизмов *Pseudomonas putida* BS394 (pBS216), *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap, постепенно адаптированных к фенолу, и выбран наиболее перспективный штамм. Методом амперометрии определены метрологические, физико-химические характеристики разработанного биосенсора на основе медиатора ферроцена и показано, что наиболее перспективным штаммом для формирования биосенсора являются адаптированные бактерии *Pseudomonas putida* BS394 (pBS216). Созданные сенсоры позволяют определять концентрации фенола 0,5 мг/дм³, коэффициент чувствительности составил $4,9 \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$ мкА·дм³/мг, константа Михаэлиса равна $6,7 \pm 0,7$ мг/дм³, максимальная скорость ферментативной реакции составила $0,73 \pm 0,06$ мкА, число окисляемых субстратов снизилось с 20 до 16, относительное стандартное отклонение аналитического сигнала не превышает 5%, время анализа составляет 5 минут.

Ключевые слова: бактерии *Pseudomonas putida* BS394 (pBS216), *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap, ферроцен, адаптация микроорганизмов, фенольный индекс, биосенсор.

Введение

Фенолы широко используются в таких отраслях, как производство пластмассы, текстиля, фармацевтики, нефти, пестицидов. В результате антропогенных воздействий, прямых выбросов промышленных предприятий происходит загрязнение водных объектов [5, 13]. Важными проблемами являются повышение чувствительности анализа — нижняя граница определяемых концентраций должна соответствовать предельно допустимым концентрациям, установленным на фенол; а также увеличение времени жизни биоматериала в рецепторных элементах биосенсоров. Однако основной проблемой микробных биосенсоров является их низкая селективность по отношению к фенольным соединениям, вызванная широкой субстратной специфичностью биоматериала. Для решения данной проблемы исследователи проводят адаптацию микроорганизмов при выращивании культуры, применяемой в биосенсорном анализе. Дан-

ный подход позволяет использовать природные штаммы микроорганизмов, не проводя их генную модификацию; при этом селективность определения фенольного индекса увеличивается.

Фенолы провоцируют перекисное окисление липидов клеточной мембраны и эритроцитов; фенол и его метаболиты могут повреждать ДНК и ферменты, оказывать канцерогенное, гепатотоксическое воздействие [7, 8], что может приводить к быстрой гибели водных организмов. Для детекции фенольных соединений в воде используются стандартные методы [3], но современная тенденция к ускорению и миниатюризации анализа привела к созданию биосенсоров [12]. Используются как сенсоры с биоматериалом на основе ферментов [11], а также на основе клеток микроорганизмов. Ферментные датчики достаточно селективны, однако на ферменты оказывают большое влияние внешние факторы (солёность, рН, температура), что приводит к значительному изменению генерируемого аналитического сигнала. Указанный недостаток практически отсутствует у цельноклеточных микроорганизмов, но такие сенсоры имеют более низкую чувствительность. Его можно устранить с помощью адаптации штамма к токсиканту. Так, в работе [9] микроорганизмы *Moraxella* sp. культивировали в минеральной среде с содержанием дрожжевого экстракта

© 2023 г. Перчиков Р.Н., Харькова А.С., Арляпов В.А.

* Автор для переписки:

Перчиков Роман Николаевич

магистрант кафедры химии, младший научный сотрудник, ФГБОУ ВО «ТулГУ»

E-mail: Perchikov_roma@mail.ru

и паранитрофенола. Представленный биосенсор для определения п-нитрофенола на основе модифицированного микроорганизмами *Moraxella sp.* графито-пастового электрода превосходит биосенсор на основе тирозиназы из работы [11].

Целью настоящей работы является разработка селективной и высокочувствительной рецепторной системы на основе адаптированных микроорганизмов к фенолу с медиатором электронного транспорта ферроценом для экспресс-детекции фенольного индекса.

Материалы и методы

Реактивы и материалы. Все требуемые реактивы имели степень чистоты х.ч. или ч.д.а. Для приготовления среды и культивирования бактерий использовали триптон («Sigma», США), дрожжевой экстракт («Oxoid Ltd.», Великобритания), хлорид натрия («Диаэм», Россия). Для изготовления графито-пастовых электродов использовали графитовую пудру («Fluka», Германия), минеральное масло («Fluka», Германия), ацетон («Диаэм», Россия), диализную мембрану («Sigma-Aldrich», Германия) (предел пропускания 14 кДа). Для анализа применяли следующие медиаторы: ферроцен («Sigma-Aldrich», Германия), для культивирования и адаптации микроорганизмов к фенолу использовали следующие вещества: сульфат аммония ((NH₄)₂SO₄, 99%, Диаэм), сульфат магния (MgSO₄×7H₂O, 99%, Диаэм), дигидрофосфат калия (KH₂PO₄, 99%, Диаэм), гидрофосфат калия (K₂HPO₄, 99%, Диаэм), хлорид кальция (CaCl₂×2H₂O, 99%, Диаэм), сульфат марганца (MnSO₄×5H₂O, 99%, Диаэм), фенол (C₆H₅OH, 99%, Диаэм) и глюкоза (C₆H₁₂O₆×H₂O, 99%, Диаэм).

Культивирование микроорганизмов. В работе использовали бактерии *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap, *Rhodococcus pyridinivorans* F5, *Pseudomonas putida* BS394(pBS216), предоставленные сотрудниками лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН ФИЦ «Пушинский центр биологических исследований». Для культивирования и адаптации микроорганизмов к фенолу использовали: сульфат аммония, сульфат магния, дигидрофосфат калия, гидрофосфат калия, хлорид кальция, сульфат марганца, фенол, глюкоза. Все реактивы имели квалификацию «х.ч.» и приобретены у компании «Диаэм» (Россия).

В работе проводили на разных стадиях адаптацию на минеральной среде со следующим составом (%): сульфат аммония (NH₄)₂SO₄ — 0,03, сульфат магния MgSO₄×7H₂O — 0,01, гидрофосфат калия K₂HPO₄

— 0,26, дигидрофосфат калия KH₂PO₄ — 0,14, хлорид кальция CaCl₂×2H₂O — 0,001 и сульфат марганца MnSO₄×5H₂O — 0,002, с глюкозой C₆H₁₂O₆×H₂O 240 мг/дм³ и с различным содержанием фенола в пробирках вместимостью 50 см³ в течение 24 часов при температуре 28 °С. Полученную биомассу отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 10000 об./мин, промывали калий-натрий-фосфатным буфером с рН 6,8, затем свежими порциями буфера переносили в микропробирки и осаждали на центрифуге «Eppendorf» в течение 10 мин при 10000 об./мин. Биомассу хранили в микропробирках при -20 °С.

Формирование рабочего электрода на основе ферроцена. При использовании растворимых медиаторов рабочий электрод формировали, наполняя приготовленной пастой «графитовая пудра-минеральное масло» пластиковую трубку. Навеску медиатора, равную 0,09 г, растворяли в 500 мкл ацетона. Далее смешивали с 0,1 г графитовой пудры и 40 мкл парафинового масла и заполняли пластиковую трубку. Клетки микроорганизмов смешивали с фосфатным буфером с рН=6,8 в отношении 1:1. Полученную смесь встряхивали в течение 5 минут, затем наносили по 10 мкл два раза на зачищенный графито-пастовый электрод и ждали полного высыхания. В качестве удерживающего материала была использована диализная мембрана, которую закрепляли на конце электрода с помощью пластикового кольца.

Биосенсорные измерения. Измерения проводили с помощью гальванопотенциостата «IPC-micro» (НПО «Вольта», Россия), используя двухэлектродную ячейку. Графито-пастовый электрод с иммобилизованными микроорганизмами использовали в качестве рабочего. В качестве электрода сравнения использовали насыщенный хлоридсеребряный электрод. Измерения проводили при температуре 20 °С в калий-натрий фосфатном буфере (рН=6,8). За ответ принимали изменение силы тока в результате введения анализируемого вещества.

Результаты и обсуждение

Влияние адаптации на селективность анализа разработанных биосенсоров

Для формирования биосенсора были использованы три вида микроорганизмов. Это: *Rhodococcus pyridinivorans* F5, *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap, которые способны эффективно окислять ароматические соединения [1, 4], *P. putida* BS394(pBS216) выделены из почвы и имеют нафталиновую плазмиду, помогающую окислять ароматические соединения.

Использование ферроцена в качестве медиатора обусловлено независимостью от рН среды электрохимических реакций, протекающих с его участием, и малой растворимостью данного соединения в воде. Малорастворимые в воде медиаторы можно иммобилизовать на поверхности рабочего электрода с целью модификации графитовой пасты. Как следствие, это обеспечивает безреагентность анализа. Все исследуемые микроорганизмы способны взаимодействовать с искусственным акцептором электронов — ферроценом, что подтверждается фактом наличия ответов биосенсора при рабочем потенциале 250 мВ, наиболее часто используемом при

работе с модифицированными графито-пастовыми электродами с иммобилизованными клетками микроорганизмов [6, 14].

При оценке селективности бактерии *Rhodococcus pyridinivorans* F5 оказались неперспективными для анализа фенола, так как окисление фенола не было зарегистрировано, а субстратные специфичности бактерий *P. putida* BS394(ρBS216) и *R. pyridinivorans* 5Ap представлены на рисунке 1. В процессе адаптации проверялась субстратная специфичность бактерий, наибольшее внимание уделялось наличию ответа на фенол и нитрофенольные соединения.

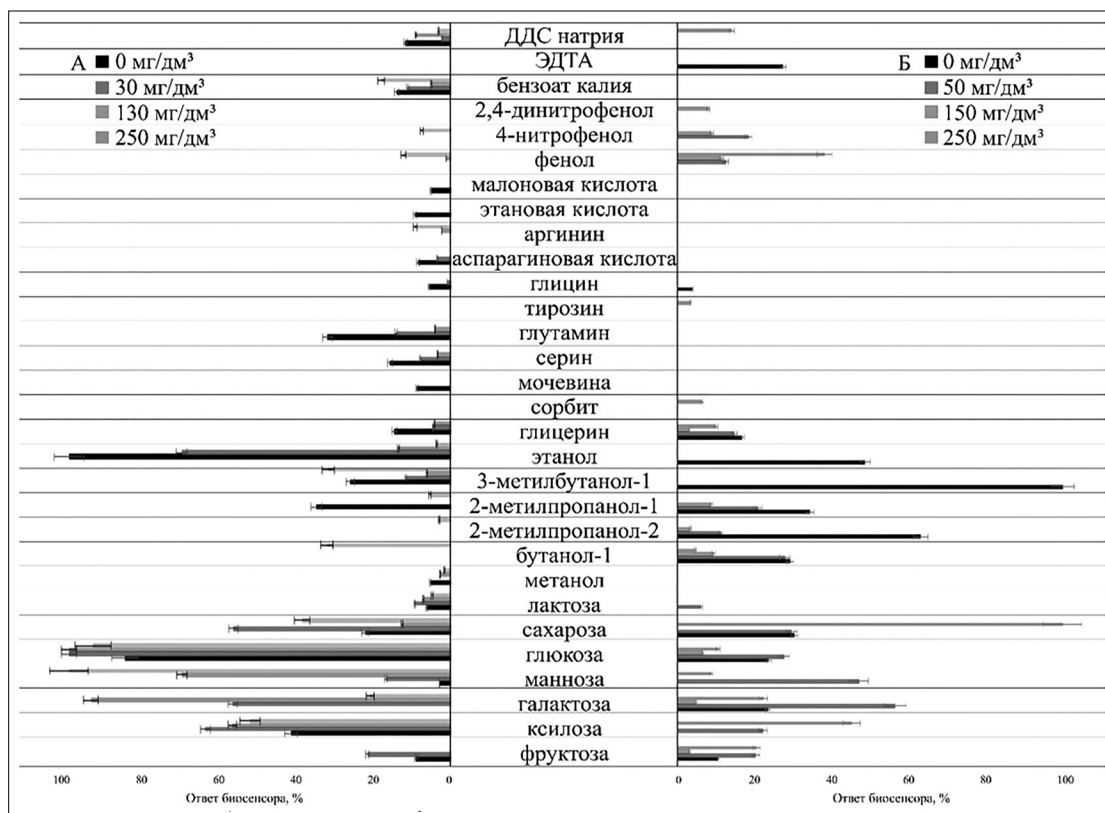


Рис. 1. Субстратные специфичности микроорганизмов на разных этапах адаптации. В легенде к диаграммам представлены концентрации фенола, при которых происходило культивирование микроорганизмом: а) *P. putida* BS394(ρBS216); б) *R. pyridinivorans* 5Ap.

Неадаптированные к фенолу микроорганизмы *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap окисляют его в малых концентрациях (0,4 мМ). В процессе адаптации микроорганизмов наблюдается сужение субстратной специфичности: снижается ответ на сахара, спирты, аминокислоты, появляется ответ на 1М фенол и его производные (рис. 1 А).

Так как адаптация проводится на среде, содержащей глюкозу и фенол в качестве источников углерода, то в начальных этапах адаптации вероятно увеличение ответов на сахара. Но при увеличении концентрации фенола в среде происходит снижение ответов на другие субстра-

ты. За три этапа адаптации удалось снизить количество окисляемых субстратов с 20 до 16, а на финальном этапе адаптации их количество составило 17.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что на достигнутых этапах адаптации у штамма *Pseudomonas putida* BS394, являющегося носителем плазмиды (ρBS216), сродство к субстрату на финальном этапе адаптации выше, чем у штамма *R. pyridinivorans* 5Ap. При этом бактерии *Pseudomonas putida* BS394(ρBS216) имеют более низкие значения нижней границы определяемых концентраций.

Характеристики рецепторных элементов на разных этапах адаптации микроорганизмов

Для определения метрологических характеристик рецепторных элементов строили градуировочные зависимости ответа биосенсора от концентрации фенола на разных этапах адаптации микроорганизмов *P. putida* BS394(ρBS216) (рис. 2).

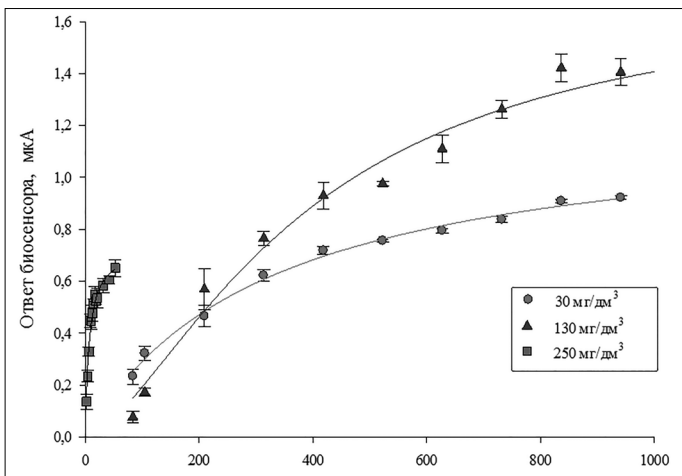


Рис. 2. Градуировочные зависимости ответа биосенсора от концентрации фенола на разных этапах адаптации микроорганизмов: *P. putida* BS394(ρBS216)

Зависимость ответа биосенсора от концентрации субстрата аппроксимировали уравнением Михаэлиса — Ментен:

$$R = \frac{R_{\max} [S]}{K_m + [S]}, \quad (1)$$

где — скорость ферментативной реакции; R_{\max} — максимальная скорость ферментативной реакции; — кажущаяся константа Михаэлиса; — начальная концентрация субстрата.

Основные метрологические и кинетические характеристики рецепторных элементов на разных этапах адаптации представлены в таблице 1.

В процессе адаптации микроорганизмов наблюдаются сходные тенденции изменения характеристик биосенсоров: вначале происходит увеличение значения кажущейся константы Михаэлиса, что указывает на то, что сродство клеток к фенолу уменьшается. Вероятно, в начале фенол оказывает токсическое влияние на микроорганизмы, но в конце адаптации сродство к фенолу у обоих штаммов увеличивается и константа Михаэлиса ниже, чем у неадаптированных микроорганизмов, что указывает на то, что клетки приспособились к окислению фенола. В процессе адаптации *P. putida* BS394(ρBS216) и *R. pyridinivorans* 5Ap наблюдается уменьшение нижней границы определяемых концентраций. Так как микроорганизмы *P. putida* BS394(ρBS216) способны окислять меньшие концентрации фенола (табл. 2), они были выбраны для дальнейшей работы.

Таблица 1

Основные метрологические и кинетические характеристики рецепторных элементов на основе микроорганизмов *P. putida* BS394(ρBS216) и *R. pyridinivorans* 5Ap

	Концентрация фенола/ глюкозы в ростовой среде, мг/дм³	K_M , мг/дм³	C_n , мг/дм³	Коэффициент чувствительности $a \cdot 10^{-3}$ мкА·дм³/мг	R_{\max} , мкА
<i>P. putida</i> BS394(ρBS216)	50/200	330±40	41,5	1,6±0,3	8,8±0,3
<i>P. putida</i> BS394(ρBS216)	150/100	900±300	36,5	2,9±0,2	2,7±0,5
<i>P. putida</i> BS394(ρBS216)	250/0	6,7±0,7	0,5	4,9±0,3	0,73±0,06
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap	50/200	0,97±0,03	1250	0,25±0,04	0,36±0,03
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap	150/100	330±50	216	0,45±0,03	0,019±0,002
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap	250/0	219±16	244	0,0031±0,0002	0,92±0,02

Аналитические и метрологические характеристики разработанных биосенсоров и их аналогов

Микро-организм	Медиатор	K_M , мг/дм ³	C_n , мг/ дм ³	Коэффициент чувствительности, мкА·дм ³ /мг	Число окисляемых субстратов, шт.	R_{max} , мг/дм ³ ·с	$t_{анализа}$, мин
<i>P. putida</i> BS394 (pBS216)	ферроцен	7±2	0,5	(0,05±0,01)·10 ⁻³	16	0,73±0,06	5
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap	ферроцен	219±16	244	(3,1±0,2)·10 ⁻³	16	0,92±0,02	5
<i>P. veronii</i> DSM 11331 ^T [2]	ферроцен	120±10	35	(7,2±0,3)·10 ⁻³	11	5,2±0,3	5
Ассоциация <i>Bacillus</i> и <i>Pseudomonas</i> [10]	-	-	19,7	(0,95±0,22)·10 ⁻³	-	-	-

В ходе адаптации удалось достигнуть сопоставимых с литературными данными показателей и даже превзойти их. Одним из главных показателей для разработанных биосенсоров является нижняя граница. В работе удалось достигнуть того, что в биосенсоре она составляет 0,5 мг/дм³, острое отравление фенолом при попадании его с водой в желудочно-кишечный тракт вызывает боль в глотке, раны во рту, ожоги слизистых, тошноту, рвоту. Вероятная летальная доза для человека при пероральном приеме 50–500 мг/кг, а проглатывание 1 грамма вещества смертельно. В данном случае можно анализировать пробы, которые превышают предел допустимых концентраций (ПДК), но еще не несут летальные последствия для организма, так как установленный ПДК составляет 0,001 мг/дм³.

Возможность проведения анализа фенола в пробах воды

Для определения фенола разработанным биосенсором необходимо использовать линейный диапазон градуировочной зависимости (рис. 3).

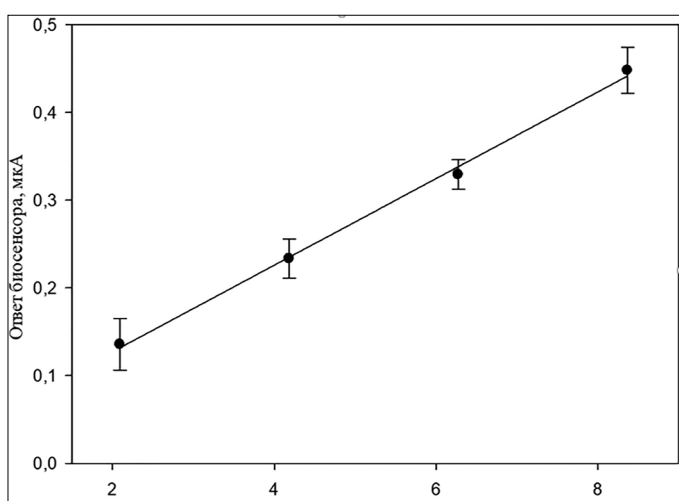


Рис. 3. Линейный диапазон ответа биосенсора на основе бактерий *Ps. putida* BS394(pBS216), адаптированных к концентрации фенола 250 мг/дм³, иммобилизованных на графитово-пастовый электрод

При определении модельных растворов фенола с концентрациями более 2 мг/дм³ относительная ошибка анализа не превышает 5%, что позволяет с достаточной точностью определять низкие концентрации фенола. Время функционирования системы или долговременная стабильность биосенсора составляет двое суток после начала эксплуатации. Биосенсор может определять с достаточно высокой точностью образцы, содержащие фенол с концентрацией, в несколько порядков превышающей ПДК. В результате полной адаптации микроорганизмов *Ps. putida* BS394(pBS216) число окисляемых субстратов снизилось с 21 до 16, при этом аналитический сигнал на 1М фенол наблюдался только у *Ps. putida* BS394(pBS216). Константа Михаэлиса для микроорганизмов *Ps. putida* BS394(pBS216) – с 330±40 мг/дм³ до 7±1 мг/дм³, что свидетельствует о большем сродстве к субстрату. У *Ps. putida* BS394(pBS216) отмечается уменьшение нижней границы определяемых концентраций с 41,5 мг/дм³ до 0,5 мг/дм³. Штамм микроорганизмов *Ps. putida* BS394(pBS216) был выбран для дальнейшего исследования.

Заключение

В результате исследования возможности использования вышеуказанных трех штаммов бактерий для оценки фенольного индекса выявлен наиболее перспективным штамм бактерий *Pseudomonas putida* BS394(pBS216) совместно с медиатором ферроценом. Данный штамм можно использовать для выделения ферментных фракций с целью улучшения селективности биосенсора. Исследовано изменение характеристик электрода в процессе адаптации микроорганизмов. Выявлено, что адаптация приводит к увеличению селективности и чувствительности биоэлектрода к анализу фенольного индекса.

Высокая чувствительность биосенсора ($C_n=0,5$ мг/дм³) свидетельствует о возможности использования

разработанной системы в качестве аналога стандартной методики для определения фенолов в различных образцах воды, особо загрязненных водоемов, как природных, так и сточных вод. В следующих работах планируется достичь нижней границы определяемых концентраций, равной ПДК 0,001 мг/дм³, за счет иммобилизации адаптированной культуры в редокс-активный полимер. Возможно использование других медиаторов электронного транспорта.

Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук, номер гранта № МК-4815.2022.1.4.

Литература

1. Букляревич А.А., Чернявская М.И., Валентович Л.Н., Охремчук А.Э., Соляникова И.П., Делеган Я.А., Филонов А.Е., Титок М.А. Физиолого-биохимические и молекулярно-генетические особенности бактерий — деструкторов углеводов *Rhodococcus pyridinivorans* 5ap. / Материалы международной научно-практической конференции «Биотехнологии микроорганизмов». Белорус. гос. ун-т. — Минск: Экоперспектива, 2019. — С. 44–47.
2. Петракова М.П., Перчиков Р.Н. Получение перспективного биоматериала путем адаптации бактерий *Pseudomonas veronii* к фенолу с целью создания биосенсора для определения фенольного индекса питьевых и сточных вод / Международная научно-техническая конференция молодых ученых БГТУ им. В.Г. Шухова. — 2021. — С. 7010–7017.
3. ПНД Ф 14.1.2:1.105-97 Количественный химический анализ воды. Способ проведения измерений массовой концентрации летучих фенолов в природных и очищенных сточных водах фотометрическим методом после дистилляции паром. — М., 1997.
4. Чернявская М.И. Характеристика штаммов нафталинутилизирующих бактерий рода *Rhodococcus* / Труды БГУ. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. — 2016. — № 11. — С. 190–197.
5. Abd Manan F.A. et al. Nanocrystalline cellulose decorated quantum dots based tyrosinase biosensor for phenol determination // Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl. — 2019. — Vol. 99. — P. 37–46.
6. Kharkova A.S. et al. A kinetic approach to the formation of two-mediator systems for developing microbial biosensors as exemplified by a rapid biochemical oxygen demand assay // 3 Biotech. — 2021. — Vol. 11. — No. 5. — P. 222. doi: 10.1007/s13205-021-02709-8.
7. Kuruto-Niwa R. et al. Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system // Environ. Toxicol. Pharmacol. — 2005. — Vol. 19. — No. 1. — P. 121–130.
8. Michałowicz J., Duda W. Phenols — Sources and Toxicity. // Polish J. Environ. Stud. — 2007. — Vol. 16. — No. 3. — P. 347–362.
9. Mulchandani P. et al. Microbial biosensor for p-nitrophenol using *Moraxella* sp. // Anal. Chim. Acta. — 2002. — Vol. 470. — No. 1. — P. 79–86.
10. Mulyawan R. et al. Biosensor performance of phenol analysis using microbial consortium of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. // AIP Conference Proceedings. — 2022. — Vol. 2638. — No. 1. — P. 50009. doi: 10.1063/5.0104743.
11. Wee Y. et al. Tyrosinase-immobilized CNT based biosensor for highly-sensitive detection of phenolic compounds // Biosens. Bioelectron. — 2019. — Vol. 132. — P. 279–285.
12. Wong A. et al. Amperometric tyrosinase biosensor based on carbon black paste electrode for sensitive detection of catechol in environmental samples // Electroanalysis. — 2021. — Vol. 33. — No. 2. — P. 431–437.
13. Yashas S.R. et al. Potentiometric polyphenol oxidase biosensor for sensitive determination of phenolic micropollutant in environmental samples // Environ. Sci. Pollut. Res. — 2020. — Vol. 27. — No. 22. — P. 27234–27243.
14. Zaitseva A.S. et al. Use of one- and two-mediator systems for developing a BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii* // Enzyme Microb. Technol. — 2017. — Vol. 98. — P. 43–51.

References

1. Buklyarevich AA, Chernyavskaya MI, Valentovich LN, Okhremchuk AE, Solyanikova IP, Delegan YAA, Filonov AYé, Titok MA. Fiziologo-biokhimicheskiye i molekulyarno-geneticheskiye osobennosti bakteriy — destruktorov uglevodorodov *Rhodococcus pyridinivorans* 5ap. Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Biotekhnologii mikroorganizmov». Belorus gos un-t. Minsk: Ekoperspektiva, 2019:44–47 (in Russian).
2. Petrakova MP, Perchikov RN. Polucheniye perspektivnogo biomateriala putem adaptatsii bakteriy *Pseudomonas veronii* k fenolu s tsel'yu sozdaniya biosensora dlya opredeleniya fenol'nogo indeksa pit'yevykh i stochnykh vod. Mezhdunarodnaya nauchno-tekhnicheskaya konferentsiya molodykh uchenykh BGTU im VG Shukhova 2021: 7010–7017 (in Russian).
3. PND F 14.1.2:1.105-97 Kolichestvennyy khimicheskyy analiz vody. Sposob provedeniya izmereniy massovoy kontsentratsii letuchikh fenolov v prirodnykh i ochishchennykh stochnykh vodakh fotometricheskim metodom posle distillyatsii parom. Moscow, 1997 (in Russian).
4. Chernyavskaya MI. Kharakteristika shtammov naftalinutiliziruyushchikh bakteriy roda *Rhodococcus*. Trudy BGU. Fiziologicheskkiye, biokhimicheskiye i molekulyarnyye osnovy funktsionirovaniya biosistem 2016; 11:190–197 (in Russian).

5. Abd Manan FA et al. Nanocrystalline cellulose decorated quantum dots based tyrosinase biosensor for phenol determination. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2019; 99:37–46.
6. Kharkova AS et al. A kinetic approach to the formation of two-mediator systems for developing microbial biosensors as exemplified by a rapid biochemical oxygen demand assay. *3 Biotech* 2021; 11(5):222. doi: 10.1007/s13205-021-02709-8.
7. Kuruto-Niwa R et al. Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system. *Environ Toxicol Pharmacol* 2005; 19(1):121–130.
8. Michałowicz J, Duda W. Phenols – Sources and Toxicity. *Polish J Environ Stud* 2007; 16(3):347–362.
9. Mulchandani P et al. Microbial biosensor for *p*-nitrophenol using *Moraxella* sp. *Anal Chim Acta* 2002; 470(1):79–86.
10. Mulyawan R et al. Biosensor performance of phenol analysis using microbial consortium of *Bacillus* sp and *Pseudomonas* sp. *AIP Conference Proceedings* 2022; 2638(1):50009. doi: 10.1063/5.0104743.
11. Wee Y et al. Tyrosinase-immobilized CNT based biosensor for highly-sensitive detection of phenolic compounds. *Biosens Bioelectron* 2019; 132:279–285.
12. Wong A et al. Amperometric tyrosinase biosensor based on carbon black paste electrode for sensitive detection of catechol in environmental samples. *Electroanalysis* 2021; 33(2):431–437.
13. Yashas SR et al. Potentiometric polyphenol oxidase biosensor for sensitive determination of phenolic micropollutant in environmental samples. *Environ Sci Pollut Res* 2020; 27(22):27234–27243.
14. Zaitseva AS et al. Use of one- and two-mediator systems for developing a BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Enzyme Microb Technol* 2017; 98:43–51.

INVESTIGATION OF METROLOGICAL CHARACTERISTICS OF RECEPTOR SYSTEMS BASED ON *PSEUDOMONAS PUTIDA* BS394(PBS216) AND *RHODOCOCCUS PYRIDINIVORANS* 5AP BACTERIA TO DETERMINE THE PHENOLIC INDEX IN AQUEOUS MEDIA

R.N. PERCHIKOV, A.S. KHARKOVA, V.A. ARLYAPOV

Tula State University, Tula

The physicochemical characteristics of a biosensor based on *Pseudomonas putida* BS394(pBS216), *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap microorganisms gradually adapted to phenol were studied and the most promising strain was selected, ferrocene mixed in graphite paste is used as a mediator of electronic transport. Metrological, physico-chemical characteristics of the developed biosensor were determined by amperometry. These results showed that the most promising strain for biosensor formation is adapted *Pseudomonas putida* BS394(pBS216). The sensors created make it possible to determine phenol concentrations of 0.5 mg/dm³, the sensitivity coefficient was $4.9 \pm 0.3 \times 10^{-3} \mu\text{A} \cdot \text{dm}^3/\text{mg}$, the Michaelis constant is $6.7 \pm 0.7 \text{ mg/dm}^3$, the maximum rate of the enzymatic reaction was $0.73 \pm 0.06 \mu\text{A}$, the number of oxidized substrates decreased from 20 to 16, the standard deviation does not exceed 5%, the analysis time is 5 minutes.

Keywords: *Pseudomonas putida* BS394(pBS216) bacteria, *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap, ferrocene, adaptation of microorganisms, phenolic index, biosensor.

Address:

Perchikov R.N., Master student of the department of chemistry,
junior researcher, Tula State University
E-mail: Perchikov_roma@mail.ru

Для цитирования:

Перчиков Р.Н., Харьковская А.С., Арляпов В.А. Исследование метрологических характеристик рецепторных систем на основе медиатора ферроцена и бактерий *Pseudomonas putida* BS394(pBS216) и *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap для определения фенольного индекса природных вод. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(2):32–38.

For citation:

Perchikov R.N., Kharkova A.S., Arlyapov V.A. Investigation of metrological characteristics of receptor systems based on *Pseudomonas putida* BS394(pBS216) and *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap bacteria to determine the phenolic index in aqueous media. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2023; 19(2):32–38 (in Russian).

БИОГЕННЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ В ВОДЕ И ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ ОНЕЖСКОГО ОЗЕРА ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ИССЛЕДОВАНИЙ 2021 И 2022 ГОДОВ

М.А. СИНЯКОВА^{1,2*}, Ю.В. КРЫЛОВА¹, Л.В. БРОННИКОВА²

¹ Санкт-Петербургский филиал ФГБНУ «ВНИРО» («ГосНИОРХ» им. Л.С. Берга),

² Санкт-Петербургский морской технический университет, Санкт-Петербург

Исследованы пробы воды и донных отложений Ладожского озера, полученные в 2021 и 2022 годах сотрудниками Санкт-Петербургского филиала ФГБНУ «ВНИРО» («ГосНИОРХ» им. Л.С. Берга). Отбор проб воды и донных отложений проводился в различных частях акватории. В пробах определяли содержание минерального, общего фосфора и аммонийного азота. Результаты исследований показывают, что уровень концентраций общего фосфора в целом соответствует олиготрофному статусу, а концентрации минерального фосфора и NH_4^+ незначительны. Содержание биогенных элементов в воде в целом выше в северо-западной части Онежского озера.

Ключевые слова: Онежское озеро, фосфор минеральный, фосфор общий, ионы аммония.

Введение

Онежское озеро — второй по величине пресноводный водоем Европы. Площадь зеркала составляет 9720 км², объем — 295 км³, средняя глубина — 30 м, наибольшая — 120 м, период условного водообмена — 15,6 лет. В химическом отношении воды озера характеризуются малой минерализацией; содержание соединений биогенных элементов тоже находится на довольно низком уровне [1, 2, 4, 8, 9, 11].

В период наблюдений за состоянием озера отмечались заметные колебания интенсивности поступления биогенных элементов в воды Онежского озера. Поступление фосфора по речным стокам в 1980-е годы оценивалось в 500 т/год, в начале 1990-х годов оно достигло своего максимума ≈700 т/г, а в 2000-е снизилось до 440 т/год. Со сточными водами крупных промышленных центров в водоем в 1990-е годы поступало в среднем 200 т/г, в 2000-е ≈170 т/год. Содержание этого элемента в поверхностном слое илов аккумуляционных зон озера к 2005 году увеличилось в 2–3 раза по отношению к уровню 1980-х годов. Характер изменения концентрации указывал на сложность процесса накопления фосфора

в донных отложениях и неравномерное поступление элемента обратно в воду, зависящее и от внешних факторов (фосфорная нагрузка на водоем, продукционные процессы и движение элемента по трофическим цепям, седиментационный режим водоема и т.д.), и от внутренних (диагенез, включающий в себя физические, химические и биологические процессы преобразования осадка). Поступивший на дно с органическим веществом фосфор проходил сложную цепь биохимических преобразований. В последние 5 лет наблюдатели отмечают уменьшение концентрации фосфора в осадках. Это позволяет предполагать восстановление озера после периода интенсивной эвтрофикации в начале 1990-х годов и возвращение его к олиготрофному статусу [1].

27 января 2022 г. на Онежском судостроительно-судоремонтном заводе (ОССЗ) в Петрозаводске состоялась церемония, посвященная началу строительства объектов глубокой модернизации предприятия [14]. Начиная с 2012 года производство было остановлено из-за банкротства [13]. В настоящее время проект глубокой модернизации Онежского ССЗ предполагает внедрение цифрового сопровождения строительства судов, роботизации и автоматизации процессов производства с увеличением производительности труда не менее чем в два раза, количества построенных судов с 3 до 10 ежегодно и с созданием не менее 500 дополнительных высокотехнологичных рабочих мест [14]. Безусловно, это начинание имеет большое значение для всего региона, но увеличение производства может сопровождаться поступлением загрязняющих веществ в окружающую среду.

© 2023 г. Синякова М.А., Крылова Ю.В., Бронникова Л.В.

* Автор для переписки:

Синякова Мария Александровна
к.х.н., ведущий научный сотрудник Лаборатории рыбохозяйственной экологии Санкт-Петербургского филиала ФГБНУ «ВНИРО» («ГосНИОРХ» им. Л.С. Берга)
E-mail: kafischem@ya.ru

Поэтому большое значение имеет мониторинг состояния вод Онежского озера.

Целью настоящей работы являлись изучение и анализ распределения концентраций биогенных элементов в водах Онежского озера. В ходе исследований, проходивших в 2021 и 2022 годах, был проведен отбор проб воды в различных частях акватории и проведен их последующий химический анализ по ряду гидрохимических показателей. Одними из важнейших показателей состояния качества водного объекта являются соединения фосфора и азота, которые наряду с природными источниками присутствуют в промышленных, сельскохозяйственных и бытовых стоках, увеличивая при поступлении фосфорную нагрузку на озеро.

Материалы и методы

Отбор проб воды и донных отложений проводился в рамках программ исследований Санкт-Петербургского филиала ФГБНУ «ВНИРО» («ГосНИОРХ» им. Л.С. Берга) в ходе рейсов, проводившихся в 2021 и 2022 годах.

Рейс 2021 года проводился в июне. Осуществлялся отбор проб воды и донных отложений. Отбор проб воды в 2022 г. был выполнен в сентябре на научно-исследовательском судне МК-501 «Протей» в трансевропейской экспедиции в рамках выполнения государственного задания ФГБНУ «ВНИРО» (Госработа 5.2) на 2022 г., в соответствии с «Планом ресурсных исследований и государственного мониторинга ВБР на 2022 г.» (п. 18). Схемы станций отбора в 2021 и 2022 гг. приведены на рисунках 1 и 2 соответственно.



Рис. 1. Схема станций отбора проб в июне 2021 года на Онежском озере

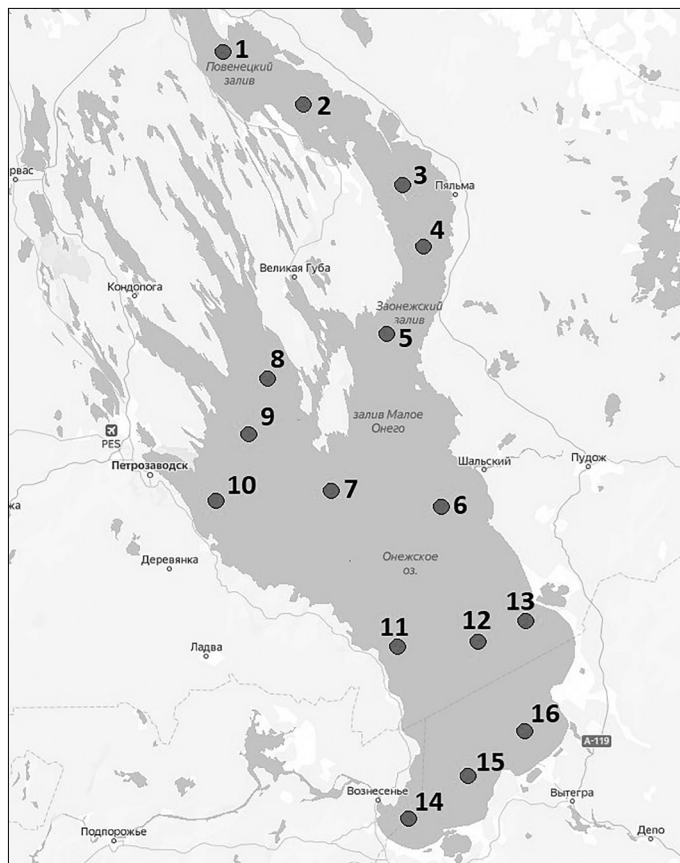


Рис. 2. Схема станций отбора проб в сентябре 2022 года на Онежском озере

В пробах воды и экстрактах из донных отложений определяли содержание минерального, общего фосфора и аммонийного азота спектрофотометрическим методом по общепринятым методикам [5, 6, 7].

Уровень трофического статуса (трофности) исследованных участков озера оценивали по содержанию общего фосфора с использованием критериев Б. Карлсона [12].

Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлены результаты исследований проб воды в июне 2021 г.

Согласно критериям определения трофности водоемов по Карлсону, для олиготрофных водоемов концентрации фосфатов по фосфору должны быть от 0 до 0,012 мг Р/дм³, для мезотрофных — от 0,012 до 0,024 мг Р/дм³, для эвтрофных — от 0,024 до 0,096 мг Р/дм³ [12].

Из результатов исследований следует, что в большинстве исследованных проб воды уровень трофности соответствует статусу олиготрофии. Исключение составляет только проба, отобранная в придонном горизонте на станции 5, концентрация общего фосфора на которой соответствует мезотрофному уровню.

Таблица 1

Содержание биогенных элементов в пробах воды, отобранных из Онежского озера в июне 2021 года

Станция	Горизонт, Н*	Фосфор минеральный, мг Р/дм ³	Фосфор общий, мг Р/дм ³	Аммоний, мг/дм ³
1	поверхность	0,0013	0,002	<0,01
	дно, 5,8 м	0,0016	0,0046	<0,01
2	поверхность	0,0013	0,003	<0,01
	дно, 18 м	0,002	0,003	<0,01
3	поверхность	0,0026	0,003	<0,01
	дно, 22,2 м	0,0008	0,003	<0,01
4	поверхность	0,0013	0,004	<0,01
	дно, 25,0 м	0,0013	0,0026	<0,01
5	поверхность	0,0026	0,005	<0,01
	дно, 13,0 м	0,0005	0,019	<0,01

Примечание: * – поверхность – поверхностный горизонт (0,3 м), дно – придонный горизонт, Н – глубина

Превышений ПДК_{вр} аммонийного азота (0,4 мг/л) выявлено не было; на всех исследуемых станциях концентрация данного компонента была ниже 0,01 мг/л.

Следует отметить, что отбор проб в 2021 году проводился только в южной части озера, подверженной антропогенному воздействию в меньшей степени, чем северная.

В таблице 2 представлены результаты исследований проб донных отложений в июне 2021 года.

Согласно полученным результатам, накопление различных форм биогенных элементов в донных отложениях довольно невелико. Относительно высокие значения общего и минерального фосфора были обнаружены только на станции 4, для которой характерен глинистый грунт.

Таблица 2

Содержание биогенных элементов в пробах грунта, отобранных из Онежского озера в июне 2021 года

Станция	Характеристика грунта	Фосфор минеральный, мг Р/кг	Фосфор общий, мг Р/кг	Аммоний, мг/кг
1	мелкий песок	0,004	0,029	<0,01
2	песок	0,006	0,006	0,385
3	песок, камни	0,003	0,003	0,295
4	коричневая глина, песок	0,013	0,032	0,05
5	камни, галька	0,003	0,01	0,12

Как известно, глинистые минералы являются алюмосиликатами и обладают слоистой или волокнистой структурой, благодаря чему способны к набуханию и обнаруживают ионообменные и сорбционные свойства. По-видимому, наличие этих свойств и обеспечивает накопление в данной точке различных фосфоросодержащих соединений. На песчаных и каменистых грунтах, характерных для остальных станций, накопление различных форм фосфора происходит в меньшей степени [3, 10].

Максимальные концентрации NH_4^+ обнаружены в преимущественно песчаных грунтах станций 2 и 3, что, возможно, объясняется обменом на поверхностных группах SiO_2 – основного компонента песка. В то же время в песчаных грунтах на станциях 1 и 3 содержание аммонийного азота незначительно. Тут, очевидно, сказывается влияние других факторов, например, переноса веществ в воде.

В таблице 3 представлены результаты исследований проб воды в сентябре 2022 года.

**Содержание биогенных элементов в пробах воды, отобранных из Онежского озера
в экспедиции в сентябре 2022 года**

Станция	Горизонт, Н*	Фосфор минеральный, мг Р/дм ³	Фосфор общий, мг Р/дм ³	Аммоний, мг/дм ³
1	поверхность	0,0102	0,017	<0,01
	дно, 90–100	0,0008	0,008	<0,01
2	поверхность	0,0008	0,011	<0,01
	дно, 20–40	0,0003	0,056	<0,01
3	поверхность	0,0008	0,012	<0,01
	дно,	0,0007	0,005	<0,01
4	поверхность	0,0008	0,005	<0,01
	дно,	0,0007	0,012	<0,01
5	поверхность	0,0003	0,007	0,53
	дно,	0,0002	0,046	<0,01
6	поверхность	0,0005	0,015	<0,01
	дно,	0,0003	0,008	<0,01
7	поверхность	0,0003	0,033	<0,01
	дно,	0,0002	0,011	<0,01
8	поверхность	0,0002	0,012	<0,01
	дно,	<0,0001	0,012	<0,01
9	поверхность	0,0005	0,013	<0,01
	дно,	0,0005	0,008	<0,01
10	поверхность	0,0003	0,028	<0,01
	дно,	0,0002	0,015	<0,01
11	поверхность	0,0003	0,004	<0,01
	дно,	0,0003	0,073	<0,01
12	поверхность	<0,0001	0,024	<0,01
	дно,	<0,0001	0,008	<0,01
13	поверхность	0,0002	0,037	<0,01
	дно,	<0,0001	0,0016	<0,01
14	поверхность	0,0003	0,009	<0,01
	дно	<0,0001	0,0002	<0,01
15	поверхность	<0,0001	0,008	<0,01
	дно,	0,0002	0,004	<0,01
16	поверхность	0,0003	0,020	<0,01
	дно,	<0,0001	0,009	<0,01
СМЗ	—	0,0003	0,0120	<0,01

*Примечание:** — Так же, как в таблице 1; СМЗ — среднее медианное значение

Из результатов, показанных в таблице 3, следует, что концентрации минерального фосфора были незначительны и в ряде случаев находились ниже пределов обнаружения ($p < 0,0001$). Концентрация общего фосфора менялась от 0,0002 (ст. 14) до 0,073 мг Р/дм³ (ст. 11), однако в большинстве случаев находилась в границах олиготрофии по градации Б. Карлсона. В части проб концентрации общего фосфора относились к мезотрофному или эвтрофному диапазону. Высокие концентрации общего фосфора, заметно выделяющиеся

на общем фоне (выше СМЗ в 2–6 раз), были зафиксированы на 6 станциях (ст. 2, 5, 7, 10, 11, 13), но в основном в придонном горизонте. В поверхностном слое была обнаружена концентрация, соответствующая эвтрофному уровню (0,028 мг Р/дм³) только на станции 10. Эта станция находится в зоне возможного влияния г. Петрозаводска и нескольких прибрежных населенных пунктов (Деревянка, Деревянное, Ужесельга), а также многочисленных форелевых хозяйств, привлекающих пристальное внимание карельских экологов (рис. 3).

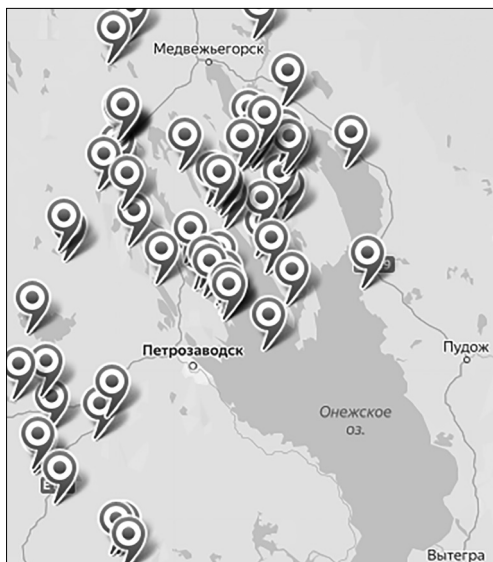


Рис. 3. Схема распределения форелевых хозяйств в районе Онежского озера

В среднем при движении с севера на юг озера содержание как минерального, так и общего фосфора снижается, что соответствует наблюдениям других исследователей [2, 4, 9]. Это вполне закономерно, так как именно на северном побережье расположены такие крупные населенные пункты, как г. Кондопога и г. Медвежьегорск. Повышенное содержание общего фосфора в придонном слое воды по сравнению с поверхностным может объясняться различными причинами: седиментацией фосфоросодержащих соединений или же наоборот: выделением из донных отложений в воду. Ряд исследователей полагает, что в период активного развития региона в 1980-х годах поступающие со стоками промышленных и сельскохозяйственных организаций соединения фосфора аккумулировались в донных отложениях. В последующий период, сопровождавшийся снижением антропогенной нагрузки, возник обратный процесс [1].

Концентрации аммонийного азота во всех пробах, кроме одной, находятся ниже пределов обнаружения. Значительное содержание NH_4^+ (выше ПДК_{вр}) отмечено только на станции 5, находящейся на акватории Заонежского залива, что в сочетании со значением концентрации общего фосфора, указывающим на эвтрофную область, наталкивает на мысль о внешнем источнике поступления этих элементов в озеро. Результаты исследований, проведенных ранее другими авторами, согласуются с этим предположением [9].

Станция 5 находится в Заонежском заливе, который сообщается с Повенецким заливом, на побережье которого находится крупный промышленный центр — г. Медвежьегорск. Движение воды может приводить к выносу загрязняющих веществ из Повенецкого в Заонежский залив, а так как оба залива сравнительно

узкие и неглубокие [9], рассеивание и «разбавление» загрязнений происходит не слишком интенсивно.

Заключение

Результаты исследований показывают, что уровень концентраций общего фосфора в целом соответствует олиготрофному статусу, за исключением некоторых акваторий. Концентрации NH_4^+ незначительны, за исключением станции 5, находящейся, по всей вероятности, в районе хронического антропогенного воздействия. Содержание биогенных элементов в воде в целом выше в северо-западной части Онежского озера.

Литература

1. Белкина Н.А. Фосфор в донных отложениях Онежского озера // Известия РГПУ им. А.И. Герцена. — 2015. — № 173. — С. 97–109.
2. Калинин Н.М., Полякова Т.Н., Сярки М.Т., Теканова Е.В. Научные основы биомониторинга Онежского озера. // Доклады Академии наук. — 2018. — Т. 482. — № 1. — С. 92–95.
3. Кокотов Ю.А. Иониты и ионный обмен. — Л.: Химия, 1980. — 152 с.
4. Лозовик П.А., Бородулина Г.С., Карпечко Ю.В., Кондратьев С.А., Литвиненко А.В., Литвинова И.А. Биогенная нагрузка на Онежское озеро по данным натуральных наблюдений / Труды Карельского научного центра РАН. — 2016. — № 5. — С. 35–52.
5. Массовая концентрация аммиака и ионов аммония в водах. Методика выполнения измерений фотометрическим методом с реактивом Несслера. — Ростов-на-Дону: Росгидромет, ГУГХИ, 2009. — 40 с.
6. Массовая концентрация фосфатного фосфора в водах. Методика измерений фотометрическим методом. — Ростов-на-Дону: Росгидромет, ФГБУ «ГХИ», 2019. — 31 с.
7. Массовая концентрация фосфора общего и фосфора валового в водах. Методика измерений фотометрическим методом после окисления персульфатом калия. — Ростов-на-Дону: Росгидромет, ФГБУ «ГХИ», 2019. — 28 с.
8. Онежское озеро. Экологические проблемы. — Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 1999. — 293 с.
9. Онежское озеро [Карты]: атлас / ВОО Русское географическое о-во, Отд-ние РГО в Республике Карелия, Учреждение Российской акад. наук Ин-т водных проблем Севера Карельского науч. центра РАН; [редкол.: отв. ред. Н.Н. Филатов и др.]. — Петрозаводск: Карельский науч. центр РАН, 2010. — 149 с.
10. Трофимов С.Я., Горшкова Е.И., Салпагарова И.А. Ионный обмен и адсорбция в почвах. — М.: КДУ, 2008. — 98 с.
11. Фомина Ю.Ю., Сярки М.Т. Современное состояние зоопланктона Петрозаводской губы Онежского озера и

его отклик на изменение климата / Труды Карельского научного центра РАН. — 2018. — № 9. — С. 54–64.

12. Carlson R.E. Estimating Trophic State // LakeLine. — 2007. — Vol. 27. — No. 1. — P. 25–28.
13. <http://onegoshipyard.ru>. Дата обращения: 5.12.2022.
14. <https://sudostroenie.info/novosti/35390.html>. Дата обращения: 5.12.2022.

References

1. Belkina NA. Fosfor v donnykh otlozheniyakh Onezhskogo ozera. Izvestiya RGPU im AI Gertsena 2015; 173:97–109 (in Russian).
2. Kalinkina NM, Polyakova TN, Syarki MT, Tekanova YeV. Nauchnyye osnovy biomonitoringa Onezhskogo ozera. Doklady Akademii nauk 2018; 482(1):92–95 (in Russian).
3. Kokotov YuA. Ionity i ionnyy obmen. Leningrad: Khimiya, 1980: 152 (in Russian).
4. Lozovik PA, Borodulina GS, Karpechko YuV, Kondrat'yev SA, Litvinenko AV, Litvinova IA. Biogennaya nagruzka na Onezhskoye ozero po dannym natumykh nablyudeniyy. Trudy Karel'skogo nauchnogo tsentra RAN 2016; 5:35–52 (in Russian).
5. Massovaya kontsentratsiya ammiaka i ionov ammoniya v vodakh. Metodika vypolneniya izmereniy fotometricheskim metodom s reaktivom Nessler. Rostov-na-Donu: Rosgidromet, GUGKHI, 2009: 40 (in Russian).
6. Massovaya kontsentratsiya fosfatnogo fosfora v vodakh. Metodika izmereniy fotometricheskim metodom. Rostov-na-Donu: Rosgidromet, FGBU «GKHI», 2019: 31 (in Russian).
7. Massovaya kontsentratsiya fosfora obshchego i fosfora valovogo v vodakh. Metodika izmereniy fotometricheskim metodom posle okisleniya persul'fatom kaliya. Rostov-na-Donu: Rosgidromet, FGBU «GKHI», 2019: 28 (in Russian).
8. Onezhskoye ozero. Ekologicheskiye problemy. Petrozavodsk: Karel'skiy nauchnyy tsentr RAN, 1999: 293 (in Russian).
9. Onezhskoye ozero [Karty]: atlas. VOO Russkoye geograficheskoye o-vo, Otd-niye RGO v Respublike Kareliya, Uchrezhdeniye Rossiyskoy akad. nauk In-t vodnykh problem Severa Karel'skogo nauch tsentra RAN; [redkol: otv red NN Filatov i dr]. Petrozavodsk: Karel'skiy nauch tsentr RAN, 2010: 149 (in Russian).
10. Trofimov SYa, Gorshkova YeI, Salpagarova IA. Ionnyy obmen i adsorbtsiya v pochvakh. Moscow: KDU, 2008: 98 (in Russian).
11. Fomina YuYu, Syarki MT. Sovremennoye sostoyaniye zooplanktona Petrozavodskoy guby Onezhskogo ozera i yego otклик na izmeneniye klimata. Trudy Karel'skogo nauchnogo tsentra RAN 2018; 9:54–64 (in Russian).
12. Carlson RE. Estimating Trophic State. LakeLine 2007; 27(1):25–28.
13. <http://onegoshipyard.ru>. Date of access: 5.12.2022.
14. <https://sudostroenie.info/novosti/35390.html>. Date of access: 5.12.2022.

BIOGENIC ELEMENTS IN WATER AND BOTTOM SEDIMENTS OF LAKE ONEGA BASED ON THE RESULTS OF STUDIES IN 2021 AND 2022

M.A. SINYAKOVA^{1,2}, Yu.V. KRYLOVA¹, L.V. BRONNIKOVA²

¹ St. Petersburg branch of the All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography (GosNIORKh named after L.S. Berg),

² St. Petersburg Marine Technical University, St. Petersburg

The samples of water and bottom sediments of Lake Ladoga, obtained in 2021 and 2022 by employees of the St. Petersburg branch of the FGBNU VNIRO. Sampling of water and bottom sediments was carried out in various parts of the water area. The content of mineral, total phosphorus and ammonium nitrogen was determined in the samples. The research results show that the level of total phosphorus concentrations generally corresponds to the oligotrophic status, while the concentrations of mineral phosphorus and NH_4^+ are insignificant. The content of biogenic elements in water is generally higher in the northwestern part of Lake Onega.

Keywords: Lake Onega, mineral phosphorus, total phosphorus, ammonium ions.

Address:

Sinyakova M.A., Candidate of chemical sciences
 Leading researcher of the Laboratory of Fisheries Ecology
 of the St. Petersburg Branch of the All-Russian Research
 Institute of Fisheries and Oceanography (GosNIORKh
 named after L.S. Berg)
 E-mail: kafischem@ya.ru

Для цитирования:

Синякова М.А., Крылова Ю.В., Бронникова Л.В. Биогенные элементы в воде и донных отложениях Онежского озера по результатам исследований 2021 и 2022 годов. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(2):39–45.

For citation:

Sinyakova M.A., Krylova Yu.V., Bronnikova L.V. Biogenic elements in water and bottom sediments of Lake Onega based on the results of studies in 2021 and 2022. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(2):39–45 (in Russian).

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИАКРОЛЕИНОВЫХ МИКРОСФЕРИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЕЙ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

А.Н. НАРКЕВИЧ, Л.В. ЛАРИОНОВА*, Д.И. СИМАКОВА, Р.В. ПИСАНОВ, М.Г. МЕЛОЯН

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

Реакция латекс-агглютинации получила широкое распространение в биохимических и иммунологических исследованиях, в диагностике инфекционных заболеваний. Объектом исследования может быть любой биологический материал, содержащий антигены или антитела. При использовании данного метода применяют монодисперсные суспензии сенсibilизированных полимерных микросфер, способных в присутствии гомологичного иммунореактива образовывать видимый агглютинат. Реакция характеризуется высокими чувствительностью и специфичностью, воспроизводимостью, простотой проведения и учета результатов, а также возможностью постановки практически в любых условиях. Реакция латекс-агглютинации или ее вариант — реакция агломерации объемная — приближается к самым современным иммунологическим методам при условии тщательной отработки методики получения латексных диагностикумов. В статье описан способ синтеза полиакролеиновых микросфер, содержащих альдегидные группы, в условиях одномоментно протекающей анионной и радикальной полимеризации. Представлены методика сенсibilизации и стабилизации полимерных носителей, а также способ постановки реакции агломерации объемной. С помощью описанной методики синтеза авторами получен ряд диагностических препаратов: иммуноглобулиновый холерный антитоксический, холерный антигенный на основе липополисахарида холерного вибриона, интерфероновый иммуноглобулиновый, псевдотуберкулезный антигенный. Приводятся аналитические характеристики экспериментальных серий диагностикумов, их чувствительность и специфичность.

Ключевые слова: полиакролеиновые микросферы; диагностикум; реакция латекс-агглютинации; чувствительность; специфичность; инфекционные заболевания.

Введение

Реакция латекс-агглютинации (РЛА) получила широкое распространение как в клинических диагностических тестах, так и в биохимических и иммунологических исследованиях. Особенно широкое применение РЛА наблюдается в диагностике инфекционных заболеваний [15, 18]. В качестве антительного или антигенного диагностикума в этих тестах используют монодисперсные суспензии сенсibilизированных полимерных микросфер (ПМ), которые в присутствии гомологичного иммунореактива образуют агглютинат, хорошо видимый невооруженным глазом. РЛА отличается простотой исполнения, не требует специального оборудования и позволяет в течение короткого времени провести визуальный учет результатов. Относительная дешевизна анализа, высо-

кая чувствительность, специфичность и воспроизводимость метода, простота и возможность постановки теста практически в любых условиях позволяют проводить экспресс-диагностику заболеваний как при одиночных, так и при массовых скрининговых исследованиях [13]. С помощью латексных тест-систем можно определять более ста возбудителей инфекционных заболеваний, в том числе бактериальных, вирусных, грибковых. Кроме того, существует более шестидесяти различных латексных тест-систем, обеспечивающих возможность определять резус-фактор, группу крови, наличие лекарственных средств, ядов и наркотиков в исследуемых образцах [14, 19, 23, 24]. Объектами исследования РЛА могут быть сыворотки крови, слюна, молозиво, моча, фекалии и др., то есть все доступные объекты, содержащие антигены или антитела. Латексные диагностикумы успешно используются при выявлении антигенов пневмококка, гемофильной палочки и менингококка непосредственно в биологических жидкостях, выявлении стрептококков, антигенов вируса краснухи, ротавирусов, антигенов *Clostridium difficile* в фекалиях, ревматоидного фактора, антигенов *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*,

© 2023 г. Наркевич А.Н., Ларионова Л.В., Симакова Д.И., Писанов Р.В., Мелоян М.Г.

* Автор для переписки:

Ларионова Людмила Владимировна

н.с. лаборатории диагностических препаратов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

E-mail: laronova-1949@list.ru

при диагностике адено- и герпесвирусных инфекций, холеры, а также для диагностики паразитарных болезней.

Таким образом, применение инертных синтетических носителей для иммобилизации антител/антигенов является широко распространенным методическим подходом в иммуноанализе. РЛА или ее вариант — реакция агломерации объемная (РАО) — могут приближаться к самым современным иммунологическим методам при условиях тщательной отработки методики получения латексных диагностикумов, соблюдении оптимальных условий подготовки и постановки самой реакции. Отмечается высокая активность и специфичность диагностикумов, при этом частота перекрестных реакций невысока [15, 18]. По своей чувствительности РЛА значительно превышает иммунодиффузные тесты, реакцию преципитации в геле и встречный иммуноэлектрофорез, не уступает реакции пассивной гемагглютинации, а при использовании специальных анализаторов для учета степени агглютинации может конкурировать с иммуноферментным и радиоиммунным анализами [3].

Одним из ключевых элементов технологии получения суспензионных диагностических тест-систем являются полимерные микросферы. В литературе описано значительное количество способов их получения методами безэмульгаторной, эмульсионной, затравочной, суспензионной, осадительной дисперсионной полимеризации. Выбор метода синтеза определяется необходимостью получения суспензий с заданным комплексом свойств [2, 3]. Однако можно сформулировать ряд общих требований к полимерным микросферам, используемым в иммунодиагностике в качестве носителей иммунореагентов:

1. Монодисперсность облегчает учет реакции агглютинации вследствие равновероятного участия в ней всех частиц, имеющих равную нагрузку сенситина.

2. Оптимальный диаметр микросфер в зависимости от метода учета иммунохимических реакций. Частицы с размерами 0,5–2,0 мкм образуют крупные агглютинаты в процессе протекания иммунохимических реакций, что обеспечивает визуальный учет результатов анализа.

3. Наличие поверхностных функциональных групп ионогенных и неионогенных. Данные функциональные группы повышают гидрофильность поверхности и в случае их ионизации обеспечивают образование электростатического барьера, что способствует повышению агрегативной устойчивости дисперсий в физиологических растворах. Реакционно-способные функциональные группы, располагающиеся на поверхности носителя,

также позволяют осуществлять ковалентное связывание сенситина.

4. Частицы должны иметь достаточную сенсibilизационную емкость для присоединения сенситина. Этому способствует введение в поверхностный слой спейсерных цепей с функциональными группами на концах, обращенных в дисперсионную среду, что обеспечивает присутствие сенситина на границе с дисперсионной средой. Однако наличие объемного гидрофильного поверхностного слоя полимера может способствовать поглощению и экранированию сенситина, понижая чувствительность иммунодиагностических тестов [11, 20].

Кроме того, к частицам, используемым в иммунодиагностических тестах, результат которых оценивается по скорости оседания агглютинатов, могут предъявляться специальные требования, связанные с плотностью полимера. Оптимальный выбор указанных параметров обеспечивает совместимость полимерной дисперсии с дисперсионной средой и ее компонентами в условиях серологической реакции, реализуя ее как единую согласованно функционирующую систему. Полимерные носители могут содержать на поверхности группы, способные непосредственно реагировать с биомолекулами, например, хлорметильные, хлорсульфоновые, альдегидные, эпоксидные и др., или группы, не способные к прямому взаимодействию с белками, однако способные образовывать с ними химическую связь после реакции активации микросфер (с карбоксильными, гидроксильными, аминными, амидными, гликолевыми поверхностными группами). При выборе микросфер, метода их синтеза и сенсibilизации необходимо учитывать, что многие реакционные группы теряются за счет гидролиза как при их синтезе, так и при сенсibilизации. Некоторые методы сенсibilизации в силу жесткости условий (бромциановые, эпоксидные микросферы) пригодны для сенсितिнов, устойчивых при высоких рН. Карбодиимидному и бромциановому методам иммобилизации свойственны побочные реакции, что влияет на воспроизводимость результатов [12, 22, 25].

Особое место в биотехнологии занимают полиакролеиновые носители. Их важное достоинство заключается в наличии на поверхности микрочастиц альдегидных групп. Эти группы устойчивы в широком диапазоне рН среды и в мягких условиях легко образуют химическую связь с биологическими молекулами, что принципиально важно при изготовлении диагностических препаратов [16, 17].

В настоящее время в Российской Федерации синтез полимерных микросфер осуществляется некоторыми

химическими и биотехнологическими учреждениями в рамках совместных медико-биологических исследований с другими научными институтами, в то время как за рубежом существует большое количество компаний, производящих полимерные микросферические носители, применяемые в диагностике ООИ, медицине и ветеринарии.

Целью работы явилась оценка возможности использования разработанного авторами способа синтеза полимерных микросфер с альдегидными группами для создания на их основе латексных диагностических препаратов.

Материалы и методы

Разработанный авторами способ синтеза полиакролеиновых микросфер, содержащих альдегидные группы, в условиях одномоментно протекающей анионной и радикальной полимеризации проводили в несколько этапов.

Непосредственно перед полимеризацией осуществляли перегонку акролеина при атмосферном давлении в присутствии гидрохинона (0,2 г гидрохинона на 100 мл акролеина). В работе использовали фракцию, кипящую при 52–54 °С. В качестве красителей использовали 1%-ные водные растворы сафранина, тионина, кумасси R-250, тионинового красного, метиленового оранжевого.

В реактор емкостью 50 мл загружали 20 мл дистиллированной воды, в которую при перемешивании на магнитной мешалке добавляли 0,12 г персульфата калия, 0,12 г поливинилпирролидона и 6 мл перегнанного акролеина. Далее при перемешивании в реакционную смесь по каплям добавляли 0,5 мл 6,6%-ного раствора тетраметилэтилендиамина (ТЕМЕД). Полимеризация начиналась в конце добавления инициатора (ТЕМЕД) и проводилась при перемешивании в течение 2,5 часов при 50 °С. По описанной рецептуре возможно получение бесцветных микросфер. Для получения окрашенных носителей перед внесением ТЕМЕД в реакционную смесь добавляли 2 мл водного раствора одного из перечисленных красителей, получая микросферы красного, фиолетового, синего или желтого цветов. Выход микросфер составлял 65%, средний диаметр — 1,0–20±0,1 мкм.

Для определения диаметра полимерных микросфер использовали метод просвечивающей электронной микроскопии. Для этого нативный материал полимерной дисперсии наносили петлей на сетку-подложку, избыток удаляли фильтровальной бумагой и высушивали. Образцы просматривали под разным увеличением в просвечи-

вающем электронном микроскопе, используя программу для расчета диаметра частиц.

Для качественного определения присутствия активных альдегидных групп 50 мг полученного носителя отмывали два раза дистиллированной водой путем центрифугирования, после чего осадок суспендировали в 0,5 мл реагента Шиффа. Через 10–20 мин взвесь окрашивалась в синий цвет, интенсивность которого возрастала в течение двух часов, что свидетельствовало о положительном результате реакции и присутствии альдегидных групп [11].

Полученные носители обладали достаточной скоростью седиментации, не взаимодействовали с материалом планшетов для иммунологических реакций, образовывали устойчивые взвеси в буферных растворах, имеющих различную ионную силу и рН как в присутствии стабилизаторов, так и без них.

Конструирование диагностических препаратов на полиакролеиновом носителе.

Для сенсibilизации полимерного носителя антигенами или иммуноглобулинами водную взвесь 100 мг полиакролеинового носителя осаждали центрифугированием при скорости 3 тыс. об./мин. в течение 5 мин. Затем осадок дважды отмывали буферным раствором, суспендировали в 2 мл буферного раствора и при перемешивании на магнитной мешалке добавляли антиген или иммуноглобулины в концентрации, подобранной для конкретного сенситина. Смесь инкубировали при постоянном перемешивании в течение 2 часов при комнатной температуре, а затем оставляли на 16 часов при температуре +4 °С. Для блокирования не связавшихся с белком активных центров на поверхности полимерного носителя к осадку, поднятому на магнитной мешалке, добавляли 2 мл 0,5%-ного раствора желатозы в забуференном физиологическом растворе и перемешивали 2 часа. Далее осадок трижды отмывали физиологическим раствором. Конечный осадок стабилизировали, суспендируя в 8 мл 0,1%-ного раствора желатозы. Оценку аналитической чувствительности полученного диагностического препарата определяли в РАО. Для повышения стабильности свойств разработанного диагностического препарата и увеличения срока его хранения осуществляли лиофилизацию, после которой повторно проводили проверку аналитической чувствительности препарата в РАО.

Постановка реакции агломерации объемной.

Непосредственно перед проведением РАО исследуемые сыворотки и нормальную кроличью сыворотку (НКС) предварительно разводили забуференным физиологическим раствором до разведения 1:10 и 1:100,

соответственно. Для получения рабочего разведения диагностикума исходный препарат разводили физиологическим раствором в 6–7 раз.

В каждую лунку 96-луночного планшета с «U»-образными лунками для иммунологических реакций вносили по 50 мкл НКС. В первую лунку каждого ряда планшета вносили 50 мкл исследуемой сыворотки и двукратно титровали до конца ряда, получая разведения: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120. Из последней лунки 50 мкл жидкости удаляли. Далее в каждую лунку планшета вносили 25 мкл диагностикума в рабочем разведении, планшет аккуратно встряхивали и оставляли при комнатной температуре.

Для проверки диагностикума на отсутствие спонтанной агломерации в две лунки планшета вносили 50 мкл НКС и 25 мкл диагностикума в рабочем разведении. После этого содержимое лунок перемешивали покачиванием планшета в течение 1 мин и оставляли на 1,5–2,0 часа при температуре 20 ± 2 °С.

При положительной реакции на дне лунки формировался цветной агломерат в виде перевернутого «зонтика» с четко очерченными краями. При отрицательной реакции и в отрицательном контроле образовывался агломерат в виде точки в центре лунки.

Результаты и обсуждение

Разработанный авторами способ синтеза полиакролеиновых микросфер с альдегидными группами на поверхности в условиях одномоментно протекающей анионной и радикальной полимеризации отличается от других, известных способов синтеза.

Известно несколько способов получения полиакролеиновых латексов с альдегидными группами на поверхности [1, 5, 9, 11, 21]. Известен способ получения полиакролеиновых латексов анионной осадительной полимеризацией акролеина в щелочной среде (рН более 11) при постепенном введении раствора щелочи в раствор акролеина и только в присутствии специально синтезированного эмульгатора — продукта взаимодействия олигомеров полиглутарового альдегида с бисульфитом натрия. Полимеризация продолжается 10 часов при комнатной температуре. Метод отличается плохой воспроизводимостью, что связано с особенностью полимеризации акролеина в водной щелочной среде, сложностью контроля скорости введения щелочного раствора и нестандартностью используемого эмульгатора; кроме того, этот метод слишком длителен.

Описан способ получения полиакролеиновых латексов анионной водно-эмульсионной полимеризацией акролеина под действием щелочи при рН 8,5–13,5. Далее через 0,5–1 мин по достижении оптической плотности 0,5–1,5 ед. в реакционную смесь добавляют эмульгатор. Недостатком метода является необходимость контроля оптической плотности реакционной смеси в условиях быстро протекающего процесса и момента введения в нее эмульгатора. Известен способ получения полиакролеиновых частиц с альдегидными группами на поверхности с повышенной химической стабильностью путем двухстадийной полимеризации. На первом этапе осуществляют традиционную анионную осадительную полимеризацию акролеина в водно-щелочной среде с добавлением раствора 0,2 N КОН до рН 10,5–11,0. Реакционную смесь перемешивают при постепенно повышающейся температуре до 35 °С в течение 1,5–2,5 часов, пока рН не понизится до 7,5–8,0. Далее, на второй стадии проводят радикальную дополимеризацию. Для этого в реакционную смесь добавляют радикальные инициаторы (персульфат калия, динатрий изобисизомаляная кислота, пероксид бензоила) в количестве 3–6% от массы акролеина. Процесс продолжают еще 2–3 часа при температуре от 40 до 90 °С в атмосфере аргона. Для получения окрашенных латексов первую стадию процесса осуществляют в присутствии 0,02–1,5% от массы акролеина водорастворимого органического красителя. Способ достаточно сложный, длительный, двухстадийный и по сути является поверхностной модификацией акролеиновых латексов, полученных анионной полимеризацией в водно-щелочной среде. Общим недостатком полиакролеиновых латексов, полученных анионной осадительной полимеризацией, являются низкая химическая стабильность и значительная загрязненность олигомерами.

Разработанная и описанная в данной работе технология синтеза полиакролеиновых микросфер обеспечивает достижение технического результата, а именно: получение монодисперсного полимерного латекса с размером частиц 1,0–2,0 мкм, оптимальными для носителя иммунореагентов, химическую и механическую стабильность, наличие реакционных альдегидных групп на поверхности частиц (1,3 ммоль/1 г полимера) в одностадийном процессе полимеризации в течение 2,5–3 часов при комнатной температуре. Она отличается от известных методов тем, что осуществляется в одну стадию, полимеризация инициируется окислительно-восстановительной системой персульфат калия-поливинилпирролидон-тетраметилэтилендиамин. Эта система генерирует образование ради-

калов, а органическое основание ТЭМЭД (промотор) является источником гидроксил-ионов. Таким образом, одновременно осуществляется радикальная и анионная полимеризация акролеина со сшивкой полимера во всем объеме образующихся латексных частиц [8].

По этой технологии синтезировано несколько серий окрашенных полимерных носителей, на основе которых сконструирован ряд экспериментальных полимерных диагностикумов, таких как иммуноглобулиновый холерный антитоксический [7], холерный антигенный на основе липополисахарида [4], интерфероновый иммуноглобулиновый [6], псевдотуберкулезный антигенный [10].

«Диагностикум иммуноглобулиновый антитоксический» для выявления холерного токсина и определения уровня токсинопродукции вибрионами представлял собой полиакролеиновые микросферы размером $1,1 \pm 0,1$ мкм, окрашенные голубым красителем (тионин). Этот носитель сенсibilizировали специфическими иммуноглобулинами к холерному токсину из кроличьих иммунных сывороток к *V. cholerae* серогруппы O1 [21]. При исследовании операционных характеристик показано, что полученный диагностикум специфичен, так как позволял выявлять холерный токсин и определять уровень токсинопродукции холерных вибрионов. В РАО диагностикум выявлял холерный токсин у токсигенных штаммов *V. cholerae* в разведении 1:16–1:512, что соответствовало концентрации 1,6–5,12 мкг/мл. При этом с нетоксигенными штаммами и липополисахаридом (ЛПС) *V. cholerae*, образцами гетерологичных культур (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Enterococcus faecalis*) и жидкой питательной средой АК1 реакция отрицательная. Аналитическая чувствительность разработанного диагностикума в РАО с препаратом холерного токсина составила 100 нг/мл.

Полимерный холерный антигенный диагностикум на основе липополисахарида представлял собой полиакролеиновые микросферы размером $1,1 \pm 0,1$ мкм, окрашенные голубым красителем (тионин). Поверхность микросфер сенсibilizировали специфическим антигеном — ЛПС *V. cholerae* серогруппы O1. При исследовании аналитических характеристик данный диагностикум демонстрировал высокие чувствительность и специфичность. Так, при проведении РАО с коммерческими и экспериментальными кроличьими сыворотками титр антител находился в диапазоне от 1:640 до 1:5120. При этом диагностикум не взаимодействовал с гетерологичными холерными сыворотками (коммерческими и экспериментальными кроличьими),

с нормальными человеческими сыворотками здоровых доноров, а также с сыворотками против возбудителей острых кишечных инфекций.

Диагностикум интерфероновый иммуноглобулиновый был получен посредством сенсibilizации частиц сферической формы размером $1,2 \pm 0,1$ мкм, окрашенных добавлением красителя (сафранин) в полимеризационную смесь в процессе синтеза. Предварительно полиакролеиновые микросферы обрабатывали танином для лучшего связывания носителя с интерфероновыми антителами, а затем сенсibilizировали иммуноглобулинами к лечебному рекомбинантному α -интерферону «Альтевир». Исследование характеристик сконструированного иммуноглобулинового интерферонового диагностикума показало его высокую чувствительность (23,5 пг/мл белка или 0,575 МЕ активности) в РАО с препаратом коммерческого лечебного альфа интерферона, а также давало возможность определять концентрацию α -интерферона во всех исследованных экспериментальных кроличьих сыворотках и в сыворотках крови больных гепатитом В в динамике интерферонотерапии.

Диагностикум псевдотуберкулезный антигенный был получен посредством сенсibilizации частиц сферической формы размером $1,5 \pm 0,1$ мкм, окрашенных добавлением красителя (сафранин) в полимеризационную смесь в процессе синтеза. Полиакролеиновые микросферы сенсibilizировали антигенным препаратом белков наружной мембраны возбудителя псевдотуберкулеза серовара O:1, содержащего общие для эпидемически значимых сероваров специфические иммунодоминантные антигены. Полученный диагностикум позволял выявлять в РАО антитела к возбудителю псевдотуберкулеза с высокой чувствительностью (86%) и специфичностью (89%). Диагностический титр для разработанного диагностикума составил 1:160.

Заключение

Проведенные исследования продемонстрировали возможность конструирования антигенных и иммуноглобулиновых полимерных диагностических препаратов для РАО, носители для которых были получены в условиях одновременно протекающей анионной и радикальной полимеризации акролеина. Сконструированные на этих носителях экспериментальные диагностические препараты отличались высокими аналитическими характеристиками, что свидетельствует о целесообразности их использования в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний.

Литература

1. Авторское свидетельство СССР1565846 «Способ получения полиакролеиновых латексов». Бахарев В.Н., Буряков А.Н., Лукин Ю.В., Грицкова И.А., Зубов В.П. Бюл. изобретений. — 1990. — № 19.
2. Генералова А.Н. Мультифункциональные полимерсодержащие дисперсные микро- и наноструктуры для биотехнологии и биомедицины: автореферат дис. ... докт. хим. наук. — Москва, 2019. — 48 с.
3. Евченко А.Ю., Жарникова И.В., Жарникова Т.В. и др. Биотехнологические разработки латексных препаратов для диагностики инфекционных болезней // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2022. — Т. 18. — № 1. — С. 60–70.
4. Ларионова Л.В., Симакова Д.И., Наркевич А.Н. и др. Конструирование диагностикума полимерного холерного антигенного на основе липополисахарида *Vibrio cholerae* O1 серогруппы // Проблемы особо опасных инфекций. — 2019. — № 4. — С. 67–72.
5. Меньшикова А.Ю., Евсеева Т.Р., Чекина Н.А., Иванчев С.С. Монодисперсные микросферы на основе сополимеров акролеина // Журнал прикладная химия. — 2001. — Т. 72. — № 10. — С. 1677–1683.
6. Патент на изобретение RU 2605621 C1, заявка № 2015127385/15 от 07.07.2015 г. Способ получения диагностикума для количественного определения лечебного рекомбинантного α -интерферона в сыворотке крови больных вирусными инфекциями. Ларионова Л.В., Наркевич А.Н., Симакова Д.И., Кочеткова А.П., Лысова Л.К., Люкшина Е.Ю.
7. Патент на изобретение RU2703282C1, заявка № 2019100730 от 10.01.2019 г. Способ получения диагностикума для определения токсина холерного вибриона, выделенного из объектов окружающей среды. Писанов Р.В., Наркевич А.Н., Ларионова Л.В., Симакова Д.И.
8. Патент на изобретение RU 2751881, заявка № 2020137228 от 11.11.2020 г. Способ получения монодисперсных полимерных микросфер с альдегидными группами. Наркевич А.Н., Ларионова Л.В., Симакова Д.И., Писанов Р.В.
9. Патент на изобретение № 2164919. Способ получения монодисперсного синтетического полимерного латекса с карбоксилированной поверхностью частиц. Меньшикова А.Ю., Евсеева Т.Г., Шабельс Б.М. / Бюл. изобретений. — 2001. — № 10.
10. Патент на изобретение № 2430376, заявка 2010133423/15 от 09.08.2010 г. Способ получения псевдотуберкулёзного антигенного полимерного диагностикума. Симакова Д.И., Ларионова Л.В., Карбышев Г.Л., Терентьев А.Н., Лысова Л.К.
11. Прокопов Н.И., Грицкова И.А., Черкасов В.Р., Чалых Ф.Е. Синтез монодисперсных функциональных полимерных микросфер для иммунодиагностических исследований // Успехи химии. — 1996. — Т. 65. — № 2. — С. 178–192.
12. Прокопов Н.И. Синтез полимерных суспензий с узким распределением частиц по размерам методом гетерофазной полимеризации: автореферат дис. ... докт. хим. наук. — Москва, 1999. — 46 с.
13. Станишевский Я.М. Создание диагностических тест-систем «Полимерная микросфера-биолиганд» медико-биологического применения: автореферат дис. ... канд. мед. наук. — Москва, 2012. — 50 с.
14. Brown D.F.G., Walpole E. Evaluation of the Mastalex latex agglutination test for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* grown on different screening media // J. Antimicrobial Chemotherapy. — 2001. — Vol. 47. — P. 187–189.
15. Camargos P.A.M., Almeida M.S., Cardoso I. Latex particle agglutination test in the diagnosis of *Haemophilus influenzae* type B, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* A and C meningitis in infants and children // J. Clin. Epidemiol. — 1995. — Vol. 48. — No. 10. — P. 1245–1250.
16. Generalova A.N., Asharchuk I.M., Zubov V.P. Multifunctional polymer dispersions for biomedical assays obtained by heterophase radical polymerization // Russ. Chem. Bull. — 2018. — Vol. 67. — No. 10. — P. 1759–1780.
17. Generalova A.N., Zubov V.P. Dispersions of polyacrolein-based multifunctional microspheres for the creation of bioanalytical and visualizing reagents // Polym. Sci. Ser. B. — 2016. — Vol. 58. — No. 4. — P. 385–410.
18. Gualano M.P., Grundy M.A., Coacley W.T. Ultrasound enhanced latex agglutination of bacteria antigen in urine // British Journal of Biomedical Science. — 1995. — Vol. 52. — No. 3. — P. 178–183.
19. Ishii K., Kumagai T., Tozuka M. et al. A new diagnostic method for adenoma malignum and related lesions: Latex agglutination test with a new monoclonal antibody // Clinica Chimica Acta. — 2001. — Vol. 312. — No. 1. — P. 231–233.
20. Kawaguchi H. Functional polymer microspheres // Prog. Polym. Sci. — 2000. — Vol. 25. — P. 1171–1210.
21. Schlund B., Pith T., Lambal M. Syntheses et caracteristiques structurelles de latex reactifs // Macromol. Chem. Suppl. — 1985. — No. 10/11. — P. 419–433.
22. Słomkowski S. Polyacrolein containing microspheres: Synthesis, properties and possible medical applications // Prog. Polym. Sci. — 1998. — Vol. 23. — No. 5. — P. 815–874.
23. Smits H.L., Chee H.D., Eapen C.K. et al. Latex based, rapid and easy assay for human leptospirosis in a single test format // Tropical Medicine & International Health. — 2001. — Vol. 6. — No. 2. — P. 114–118.
24. Sobanski M.A., Robert Tucker C., Thomas N.E. et al. Sub-micron particle manipulation in an ultrasonic standing wave: Applications in detection of clinically important biomolecules // Biosepar. — 2000. — Vol. 9. — No. 6. — P. 351–357.

25. Xia Y. et al. Monodispersed colloidal spheres: Old materials with new applications // Adv. Mater. — 2000. — Vol. 12. — No. 10. — P. 693–713.

References

1. Avtorskoye svidetel'stvo SSSR1565846 «Sposob polucheniya poliakroleinovykh lateksov». Bakharev VN, Buryakov AN, Lukin YuV, Gritskova IA, Zubov VP. Byul. izobreteniy. 1990; 19 (in Russian).
2. Generalova AN. Mul'tifunktional'nyye polimersoderzhashchiye dispersnyye mikro- i nanostruktury dlya biotekhnologii i biomeditsiny: avtoreferat dis ... dokt khim nauk. Moscow, 2019: 48 (in Russian).
3. Yevchenko AYu, Zharnikova IV, Zharnikova TV i dr. Biotekhnologicheskkiye razrabotki lateksnykh preparatov dlya diagnostiki infektsionnykh bolezney. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova 2022; 18(1):60–70 (in Russian).
4. Larionova LV, Simakova DI, Narkevich AN i dr. Konstruirovaniye diagnostikuma polimernogo kholernogo antigennogo na osnove lipopolisakharida *Vibrio cholerae* O1 serogruppy. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2019; 4:67–72 (in Russian).
5. Men'shikova AYu, Yevseyeva TR, Chekina NA, Ivanchev SS. Monodispersnyye mikrosfery na osnove sopolimerov akroleina. Zhurnal prikladnaya khimiya 2001; 72(10):1677–1683 (in Russian).
6. Patent na izobreteniyе RU 2605621 C1, zayavka № 2015127385/15 ot 07.07.2015 g. Sposob polucheniya diagnostikuma dlya kolichestvennogo opredeleniya lechebnogo rekombinantnogo α -interferona v syvorotke krovi bol'nykh virusnymi infektsiyami. Larionova LV, Narkevich AN, Simakova DI, Kochetkova AP, Lysova LK, Lyukshina Ye Yu (in Russian).
7. Patent na izobreteniyе RU 2703282S1, zayavka № 2019100730 ot 10.01.2019 g. Sposob polucheniya diagnostikuma dlya opredeleniya toksina kholernogo vibriona, vydelennogo iz ob'yektov okruzhayushchey sredy. Pisanov RV, Narkevich AN, Larionova LV, Simakova DI (in Russian).
8. Patent na izobreteniyе RU 2751881, zayavka № 2020137228 ot 11.11.2020 g. Sposob polucheniya monodispersnykh polimernykh mikrosfer s al'degidnymi gruppami. Narkevich AN, Larionova LV, Simakova DI, Pisanov RV (in Russian).
9. Patent na izobreteniyе № 2164919. Sposob polucheniya monodispersnogo sinteticheskogo polimernogo lateksa s karboksilirovannoy poverkhnost'yu chastits. Men'shikova AYu, Yevseyeva TG, Shabsel's BM. Byul. izobreteniy 2001; 10 (in Russian).
10. Patent na izobreteniyе № 2430376, zayavka 2010133423/15 ot 09.08.2010 g. Sposob polucheniya psevdotuberkuloznogo antigennogo polimernogo diagnostikuma. Simakova DI, Larionova LV, Karbyshev GL, Terent'yev AN, Lysova LK (in Russian).
11. Prokopov NI, Gritskova IA, Cherkasov VR, Chalykh FYe. Sintez monodispersnykh funktsional'nykh polimernykh mikrosfer dlya immunodiagnosticheskikh issledovaniy. Uspekhi khimii 1996; 65(2):178–192 (in Russian).
12. Prokopov NI. Sintez polimernykh suspenziy s uzkim raspredeleniyem chastits po razmeram metodom geterofaznoy polimerizatsii: avtoreferat dis ... dokt khim nauk. Moscow, 1999; 46 (in Russian).
13. Stanishevskiy YaM. Sozdaniye diagnosticheskikh test-sistem «Polimernaya mikrosfera-bioligand» mediko-biologicheskogo primeneniya: avtoreferat dis ... kand med nauk. Moscow, 2012; 50 (in Russian).
14. Brown D.F.G., Walpole E. Evaluation of the Mastalex latex agglutination test for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* grown on different screening media. J. Antimicrobial Chemotherapy 2001; 47:187–189.
15. Camargos PAM, Almeida MS, Cardoso I. Latex particle agglutination test in the diagnosis of *Haemophilus influenzae* type B, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* A and C meningitis in infants and children. J Clin Epidemiol 1995; 48(10):1245–1250.
16. Generalova AN, Asharchuk IM, Zubov VP. Multifunctional polymer dispersions for biomedical assays obtained by heterophase radical polymerization. Russ Chem Bull 2018; 67(10):1759–1780.
17. Generalova AN, Zubov VP. Dispersions of polyacrolein-based multifunctional microspheres for the creation of bio-analytical and visualizing reagents. Polym Sci Ser B 2016; 58(4):385–410.
18. Gualano MP, Grundy MA, Coacley WT. Ultrasound enhanced latex agglutination of bacteria antigen in urine. British Journal of Biomedical Science 1995; 52(3):178–183.
19. Ishii K, Kumagai T, Tozuka M et al. A new diagnostic method for adenoma malignum and related lesions: Latex agglutination test with a new monoclonal antibody. Clinica Chimica Acta 2001; 312(1):231–233.
20. Kawaguchi H. Functional polymer microspheres. Prog Polym Sci 2000; 25:1171–1210
21. Schlund B, Pith T, Lambla M. Syntheses et caracteristiques structurelles de latex reactifs. Macromol Chem Suppl 1985; 10/11:419–433.
22. Slomkowski S. Polyacrolein containing microspheres: Synthesis, properties and possible medical applications. Prog Polym Sci 1998; 23(5):815–874.
23. Smits HL, Chee HD, Eapen CK et al. Latex based, rapid and easy assay for human leptospirosis in a single test format. Tropical Medicine & International Health 2001; 6(2):114–118.
24. Sobanski MA, Robert Tucker C, Thomas NE et al. Submicron particle manipulation in an ultrasonic standing wave: Applications in detection of clinically important biomolecules. Biosepar 2000; 9(6):351–357.
25. Xia Y et al. Monodispersed colloidal spheres: Old materials with new applications. Adv Mater 2000; 12(10):693–713.

APPLICATION OF POLYACROLEIN MICROSPHERICAL CARRIERS IN LABORATORY DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS DISEASES

A.N. NARKEVICH, L.V. LARIONOVA, D.I. SIMAKOVA, R.V. PISANOV, M.G. MELOYAN

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

The reaction of latex agglutination is widely used in biochemical and immunological studies, in the diagnosis of infectious diseases. The objects of research can be any biological material containing antigens or antibodies. When using this method, monodisperse suspensions of sensitized polymeric microspheres are used, which are capable of forming a visible agglutinate in the presence of a homologous immunoreagent. The reaction is characterized by high sensitivity and specificity, reproducibility, ease of carrying out and recording results, as well as the possibility of staging in almost any conditions. The latex agglutination reaction or its variant — the volumetric agglomeration reaction — approaches the most modern immunological methods, provided that the methodology for obtaining latex diagnosticums is carefully developed. The article describes a method for the synthesis of polyacrolein microspheres containing aldehyde groups under conditions of simultaneous anionic and radical polymerization. The method of sensitization and stabilization of polymeric carriers, as well as the method of setting up the volumetric agglomeration reaction are shown. With the help of the described method of synthesis, a number of diagnostic preparations were obtained — immunoglobulin cholera antitoxic, cholera antigenic based on lipopolysaccharide of vibrio cholerae, interferon immunoglobulin, pseudotuberculous antigenic. Analytical characteristics of the experimental series of diagnosticums — sensitivity and specificity are given.

Keywords: polyacrolein microspheres; diagnosticum; latex agglomeration reaction; sensitivity; specificity; infectious disease.

Address:

Larionova L.V.

researcher laboratory of diagnostic preparations

Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

E-mail: larionova-1949@list.ru

Для цитирования:

Наркевич А.Н., Ларионова Л.В., Симакова Д.И., Писанов Р.В., Мелоян М.Г. Применение полиакролеиновых микросферических носителей в лабораторной диагностике инфекционных болезней. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(2):46–53.

For citation:

Narkevich A.N., Larionova L.V., Simakova D.I., Pisanov R.V., Meloyan M.G. Application of polyacrolein microspherical carriers in laboratory diagnostics of infectious diseases. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(2):46–53 (in Russian).

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНКазной АКТИВНОСТИ В ПРИСУТСТВИИ ИНТЕРКАЛИРУЮЩЕГО КРАСИТЕЛЯ

Д.С. КАЛИНИН^{1*}, П.В. ЕВТЕХОВА², Л.Г. МАЛАЕВ³, М.А. ЕРЕМИНА³,
С.Г. МАЙОРОВ⁴, М.Г. ШЛЯПНИКОВ⁴, И.Э. ГРАНОВСКИЙ^{1,4}

¹ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва; ² Тульский государственный университет, Тула; ³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва; ⁴ Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушкино, Московская область

Тест на определение ДНКазной активности применяется для идентификации патогенных микроорганизмов, а также в диагностике онкологических и аутоиммунных заболеваний. В данной работе нами предложен простой, воспроизводимый метод детекции неспецифической ДНКазной активности в присутствии интеркалирующего красителя Eva Green. В качестве неспецифической ДНКазы использовали колицин E9 *Escherichia coli*, в качестве субстрата — плазмидную ДНК или двунитевые олигонуклеотиды. Дegradaция субстратов сопровождается снижением сигнала флуоресценции, детектируемого в режиме реального времени. Время анализа, в зависимости от концентрации ДНКазы, составляет от 20 до 60 минут, где, в случае с олигонуклеотидным субстратом, плавление продуктов реакции при 60 °С позволяет повысить чувствительность и сократить время анализа.

Ключевые слова: тест на ДНКазную активность, колицин E9, олигонуклеотиды, интеркалирующий краситель.

Введение

Тесты на неспецифическую ДНКазную активность находят свое применение в различных разделах микробиологии. Наличие ДНКазной активности в среде культивирования некоторых микроорганизмов, в том числе патогенных, служит дополнительным критерием их идентификации. Традиционно тест на ДНКазную активность используется при выявлении патогенных стафилококков. Этот тест также помогает в дифференциации близкородственных родов *Klebsiella*, *Enterobacter* и *Serratia* семейств *Enterobacteriaceae* и *Yersiniaceae*, а также некоторых других патогенов, включая *Corynebacterium diphtheriae* [7, 12, 13].

Определение активности ДНКаз применяется также и в медицине. ДНКазы являются естественным компонентом сыворотки крови. Одна из основных функций ДНКаз крови заключается в деградации ДНК,

которая высвобождается из умерших собственных или микробных клеток и обладает высокой иммуностимулирующей способностью. Снижение уровня ДНКазной активности в крови связывают с патогенезом нескольких аутоиммунных заболеваний: системной красной волчанки, синдромом Шегрена, аутоиммунных заболеваний щитовидной железы и воспалительных заболеваний кишечника [1, 4, 17].

В настоящее время существуют разнообразные методы для определения дезоксирибонуклеазной активности. Ряд методов основан на выращивании микроорганизмов на твердых питательных средах, содержащих ДНК. В классическом варианте для идентификации микроорганизмов, продуцирующих ДНКазу, чашки с выросшими колониями микроорганизмов обрабатывают раствором соляной кислоты [8, 18]. Это приводит к помутнению питательного агара из-за выпадения ДНК в осадок. При этом вокруг колоний микроорганизмов, секретирующих ДНКазу, агар остается прозрачным вследствие деградации ДНК. Этот достаточно простой метод обладает невысокой чувствительностью, а его проведение занимает продолжительное время, необходимое для роста микроорганизмов.

Альтернативой данному методу является тест на ДНК-агаре с добавлением метиленового зеленого или толуидинового синего [2, 16, 14, 18, 19]. ДНК-агар в

© 2023 г. Калинин Д.С., Евтехова П.В., Малаев Л.Г., Еремина М.А., Майоров С.Г., Шляпников М.Г., Грановский И.Э.

* Автор для переписки:

Калинин Данил Сергеевич

младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

E-mail: 309163@gmail.com

присутствии вышеуказанных красителей окрашен, соответственно, зеленым или синим цветом. После деградации ДНК агар обесцвечивается в случае метиленового зеленого, либо меняет цвет на розовый в случае толуидинового синего. Реакция проводится в течение 2–6 часов.

Широко используемый метод определения ДНКазной активности в растворе, предложенный Куницем, основан на гиперхромном эффекте — увеличении поглощения раствора полимерной ДНК при 260 нм в результате её гидролиза [9]. Поскольку этот метод обладает невысокой чувствительностью и для его проведения требуется достаточно большое количество фермента и субстрата, было предложено использовать в ДНКазном тесте вещества, изменяющие свои спектральные характеристики при связывании с ДНК. Например, определение активности дезоксирибонуклеазы I на высокополимеризованной ДНК в комплексе с метиловым зеленым позволило разработать достаточно простой и высокопроизводительный количественный анализ [15]. При деградации ДНК происходит высвобождение метилового зеленого и уменьшается поглощение раствора при 620 нм. Варьируя время и температуру реакции, анализ позволяет количественно определять активность ДНКазы I в широком диапазоне концентраций от 0,4 до 8900 нг/мл. Данный подход получил развитие в работе ЛАТ Чои с соавторами [3]. Ими предложено для оценки степени деградации ДНК использовать флуоресцентный краситель пикогрин (PicoGreen), который усиливает свою флуоресценцию при связывании с ДНК. В стандартном анализе 0,2 мкг субстратной ДНК инкубировали с ДНКазой I, в конце реакции добавляли разбавленный реагент пикогрин и измеряли интенсивность флуоресценции. С помощью этого анализа можно определить всего 5 пг ДНКазы I в течение часа. Более того, используя небольшое количество субстратной ДНК, метод оказался пригодным для чувствительного определения активности ингибитора ДНКазы I.

Оригинальный метод детекции ДНКазной активности был предложен ЛАТ Жоу с соавторами [20]. Он основан на двух свойствах оксида графена: различное сродство к длинным и коротким фрагментам двуниевой ДНК, а также способностью гасить флуоресценцию определенных молекул. В качестве субстрата в данной работе использовалась двуниевая ДНК, меченная флуоресцеином. Первоначально флуоресценция субстратной ДНК гасилась при добавлении оксида графена. Когда к смеси двуниевой ДНК и оксида графена добавляли нуклеазу, происходил гидролиз ДНК. В результате

комплекс оксид графена-ДНК диссоциировал, что приводило к восстановлению флуоресценции.

Другой чувствительный метод детекции был предложен в работе [11]. Авторы использовали самокомплементарные олигонуклеотиды, содержащие флуоресцентную метку и соответствующий гаситель флуоресценции. Флуоресценция такой ДНК восстанавливалась после пространственного разделения метки и гасителя вследствие расщепления ДНКазой. Существенным недостатком двух последних методов является дороговизна используемых в них субстратов.

В настоящей работе была поставлена цель, с учетом опыта предыдущих исследований, разработать относительно недорогой, простой в исполнении, чувствительный и высокопроизводительный метод определения ДНКазной активности в режиме реального времени. Предлагаемый подход основывается на анализе ДНКазной активности с использованием в качестве субстрата плазмидной ДНК или двуниевых олигонуклеотидов в присутствии интеркалирующего красителя, который изменяет свои флуоресцентные свойства при связывании с ДНК (рис. 1).

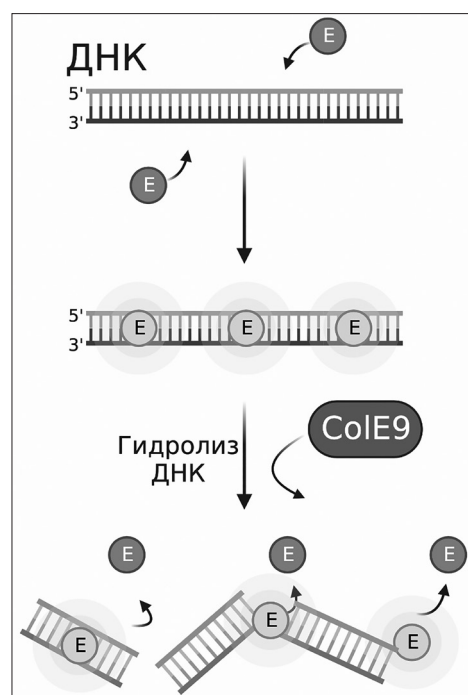


Рис. 1. Схема определения ДНКазной активности в присутствии интеркалирующего красителя Eva Green. Col E9 — колицин E9, E — Eva Green

Детекцию флуоресценции предлагается проводить в реальном времени на отечественном амплификаторе ДТлайт, нашедшем в последние годы широкое распространение в научных исследованиях.

Материалы и методы

Измерение сигнала флуоресценции

Для измерения сигнала флуоресценции использовался Амплификатор детектирующий ДТлайт (ДНК-Технология, Россия). Измерения сигнала флуоресценции проводили на каналах FAM, Rox и Cy5.

Олигонуклеотиды. Последовательности олигонуклеотидов, использованных в настоящей работе, приведены в таблице 1. Двунитевые олигонуклеотидные субстраты готовились следующим образом: олигонуклеотиды R-SD10 up и Q-SD11 lo или SD11 lo и SD10 up смешивали попарно в концентрации 20 мкМ каждый в буфере (10 мМ трис, HCl, 8,0, 25 мМ NaCl). Данную смесь прогревали в кипящей водяной бане в течение 3 мин, после чего медленно охлаждали до комнатной температуры.

Таблица 1

Список олигонуклеотидов, использованных в работе

Праймеры	Нуклеотидная последовательность	T _m , °C
R-SD10 up	5' ROX-CCTTAAATCGTCAAAGA TTAGATACCTTTAACATATACAC GTC 3'	65,9
Q-SD11 lo	5' GACGTGTATATGTTAAAGGTA TCTAATCTTTGACGATTTAAGG- RTQ2 3'	65,9
SD10 up	5' CCTTAAATCGTCAAAGATTA GATACCTTTAACATATACACG TC 3'	65,9
SD11 lo	5' GACGTGTATATGTTAAAGGT ATCTAATCTTTGACGATTTAA GG 3'	65,9

Определение ДНКазной активности

Реакцию проводили в 25 мкл смеси, содержащей реакционный буфер (50 мМ трис-HCl, pH 7,4, 80 мМ NaCl и 10 мМ MgCl₂), 8 нг/мкл плазмиды ρRSFDuet-1 (очищена с использованием набора «QIAprep Plasmid Spin Midi Kit» (Qiagen, США)) или 0,25 мкМ олигонуклеотидного субстрата, 2,25 мкМ интеркалирующего красителем EVA Green и колицин E9 в концентрации 0,4 мкМ. Реакцию проводили при 30 °C. Деградацию плазмидной ДНК детектировали в режиме реального времени в ПЦР-приборе в течение 1 часа на канале FAM. Для минимизации ошибки каждый эксперимент был выполнен дважды, не менее чем в трех повторах. Для электрофоретического анализа реакцию гидролиза останавливали добавлением ЭДТА до концентрации 10

мМ, продукты гидролиза разделяли в 1%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия и визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете.

Определение ДНКазной активности с использованием флуоресцентно меченных олигонуклеотидов проводилось в тех же условиях с той лишь разницей, что вместо интеркалирующего красителя Eva Green в реакционной смеси присутствовали флуоресцентно меченные олигонуклеотиды в концентрации 2,8 мкМ. Изменение флуоресценции детектировали на канале Rox.

Для нормализации флуоресценции образцов в реакцию добавляли флуоресцентный краситель Rox в концентрации 0,32 мкМ для образцов с интеркалирующим красителем или Cy5.1 в концентрации 0,26 мкМ для флуоресцентно меченных олигонуклеотидов.

Результаты и обсуждение

Получение очищенного препарата колицина E9

Отработка метода определения ДНКазной активности проводилась на модели неспецифической ДНКазы колицин E9. Экспрессия и очистка колицина E9 осуществлялась по методу, указанному в статье [6]. Для наработки колицина E9 использовалась конструкция ρRJ353 — любезно предоставлена проф. Клинтхаузом (Colin Kleanthous). Полученный препарат колицина E9 применялся в последующих экспериментах (рис. 2).

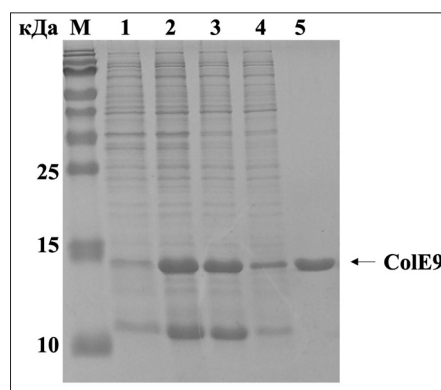


Рис. 2. Экспрессия в клетках *E. coli* и очистка колицина E9. Дорожки: М — маркеры молекулярных весов; 1 — грубый лизат клеток BL21(DE3)/ρRJ353 до индукции; 2 — грубый лизат клеток BL21(DE3)/ρRJ353 после индукции; 3 — осветленный лизат клеток BL21(DE3)/ρRJ353 после индукции; 4 — фракция белков, несвязавшихся с Ni-NTA-агарозой при нанесении; 5 — препарат колицина E9 после элюции и ренатурации

Оптимизация условий ДНКазного теста

В рассматриваемом исследовании использован интеркалирующий краситель Eva Green для детекции нуклеазной активности. Он обладает близкими спектральными характеристиками с широко используемым SYBR Green, но, в отличие от последнего, не проявляет предпочтительности к ДНК с различным ГЦ-составом, а также не оказывает значительного ингибирующего эффекта на синтез ДНК в ходе ПЦР [10].

На первом этапе была подобрана граница насыщающей концентрации Eva Green при заданной концентрации ДНК, так, чтобы не был превышен максимально допустимый уровень флуоресценции, детектируемой амплификатором «ДТлайт». В анализе использовалась плазмидная ДНК, концентрация которой в реакционной смеси составила 8 нг/мкл. Концентрация Eva Green в реакции варьировала в диапазоне от 4 до 0,15 мкМ. Результаты анализа представлены на рисунке 3. Флуоресценция была максимальной вплоть до концентрации Eva Green 3 мкМ и незначительно снижалась при уменьшении его концентрации до 2,25 мкМ. При концентрации красителя в реакционной смеси 1,5, 0,5 и 0,15 мкМ его флуоресценция составляла, соответственно, ≈ 80, 50 и 20% от максимальной. Исходя из полученных данных, в дальнейших экспериментах Eva Green использовался в концентрации 2,25 мкМ.

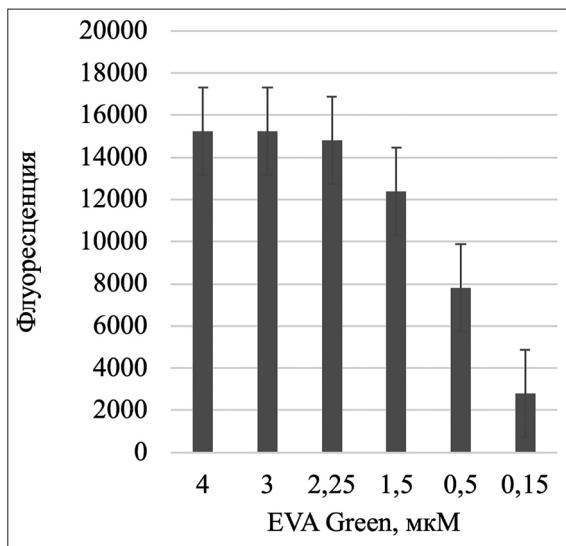


Рис. 3. Зависимость флуоресценции Eva Green от его концентрации. Реакционная смесь содержала плазмидную ДНК, как описано в материалах и методах. Значения флуоресценции приведены в значениях оптических показаний прибора ДТлайт

Затем было оценено влияние Eva Green на ДНКазную активность колицина E9. Для этого плазмидная ДНК обрабатывалась колицином E9 в различной концентрации в присутствии и отсутствии Eva Green, после чего проводили электрофоретический анализ продуктов гидролиза (рис. 4). При высоком содержании колицина (1,3 мкМ) полная деградация субстрата наблюдалась в обоих случаях, тогда как при концентрации колицина 0,13 мкМ отмечалось некоторое ингибирование ДНКазной активности, которое становилось более ярко выраженным при снижении концентрации колицина в реакции еще на порядок. Предположительно, наблюдаемое ингибирование является несущественным, учитывая высокий уровень ДНКазной активности во внеклеточной среде продуцирующих микроорганизмов [5], и не способно оказать значительного ограничения на использование предлагаемого метода.

Рис. 4. Влияние Eva Green на активность колицина E9. М — маркер длин фрагментов ДНК; дорожки 1, 2 и 3 — концентрация колицина E9 в реакции составила 1,3, 0,13 и 0,013 мкМ, соответственно; К — реакционная смесь без колицина E9

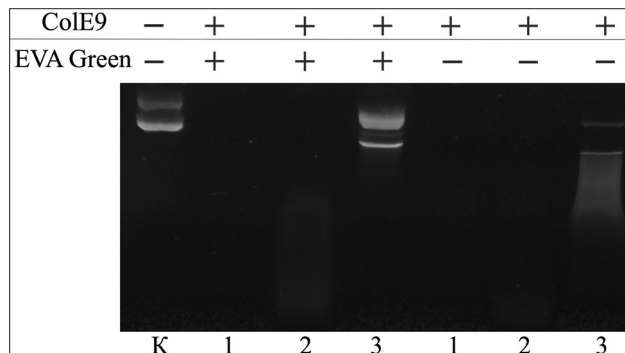


Рис. 4. Влияние Eva Green на активность колицина E9. М — маркер длин фрагментов ДНК; дорожки 1, 2 и 3 — концентрация колицина E9 в реакции составила 1,3, 0,13 и 0,013 мкМ, соответственно; К — реакционная смесь без колицина E9

Тестирование ДНКазной активности колицина E9 на плазмидной ДНК.

ДНКазная активность колицина анализировалась при концентрации плазмидной ДНК в реакции 4, 8 и 16 нг/мкл. Концентрация колицина в этом эксперименте была фиксирована и составила 0,4 мкМ. Измерение флуоресцентного сигнала проводилось в режиме реального времени в ПЦР-анализаторе «ДТ-лайт». Через определенные интервалы времени отбирались пробы и продукты реакции анализировали электрофоретически в агарозном геле с целью установления корреляции между сигналом флуоресценции и степенью деградации исходной ДНК. Результаты анализа представлены на рисунке 5 (А, Б). При концентрации плазмидной ДНК 4 и 8 нг/мкл падение сигнала флуоресценции, свидетельствующее о деградации субстрата, начиналось на 5- и 10-й минутах, соответственно. Сходный характер кривых изменения флуоресценции указывает на близ-

кие значения скоростей реакции гидролиза при данных концентрациях субстрата (см. рис. 5 А). В случае, когда концентрация плазмидного субстрата составляла 16 нг/мкл, падение сигнала флуоресценции начиналось только на 15-й минуте, и скорость падения сигнала была существенно более низкой. Электрофоретический анализ образцов, отбор которых проводили через определенные интервалы времени в ходе реакции (см. рис. 5), продемонстрировал большую чувствительность: наличие продуктов гидролиза уверенно детектировалось уже на 7-й минуте во всех вариантах реакционной смеси. Это может быть объяснено тем, что для высвобождения молекул Eva Green из комплекса с ДНК необходим определенный уровень её деградации.

Оценка чувствительности метода проводилась при концентрации колицина E9 в реакции 0,4, 0,24 и 0,08 мкМ (см. рис. 5 В, Г). Результаты анализа продемонстрировали, что падение сигнала флуоресценции на 50% происходит за ≈ 20 минут при концентрации колицина 0,4 мкМ и за ≈ 30 минут при концентрации колицина 0,24 мкМ. При концентрации колицина 0,08 мкМ достоверное снижение флуоресцентного сигнала наблюдалось за время, близкое к 60 минутам, что соответствует порогу чувствительности метода. Результаты флуоресцентного и электрофоретического анализов в целом соответствуют друг другу, при этом тенденция более высокой чувствительности электрофоретического метода сохраняется (см. рис. 5).

Тестирование ДНКазной активности колицина E9 на двунитевых олигонуклеотидах.

Альтернативным субстратом для определения ДНКазной активности могут быть короткие ДНК фрагменты, в простейшем варианте образованные из двух взаимодополнительных олигонуклеотидов. В настоящей работе эксперименты проводились на модельном олигонуклеотиде длиной 43 п.н., полученном из SD 10 up и SD 11 lo (см. табл. 1), как описано в разделе «Материалы и методы». Концентрация олигонуклеотидного субстрата и Eva Green в реакционной смеси составляла 0,25 мкМ и 2,25 мкМ, соответственно. Анализ проводился при концентрациях колицина E9 в реакционной смеси 0,16, 0,32 и 0,8 мкМ.

Кроме того, для сравнительной оценки чувствительности была проанализирована активность колицина E9 на другом субстрате, содержащем на 5'-конце одной цепи флуоресцентный краситель ROX и гаситель флуоресценции RTQ-2 — на 3'-конце второй цепи (см. табл. 1), аналогичном описанному в литературе [11]. Если в случае первого субстрата гидролиз сопровождался падением флуоресцентного сигнала, то в случае второго — ростом, обусловленным пространственным разобщением флуоресцентной метки и гасителя.

Результаты анализа представлены на рисунке 6. В реакциях с олигонуклеотидным субстратом в присутствии EVA Green уровень флуоресценции после обработки ДНКазой изменялся так же, как и в реакциях с плазмидной ДНК: после некоторой задержки начиналось падение флуоресцентного сигнала, которое продолжалось вплоть до окончания измерений (точка 60 мин., см. рис. 6). В реакции же с флуоресцентно меченным субстратом прирост флуоресцентного сигнала начинается сразу после добавления ДНКазы с плавным

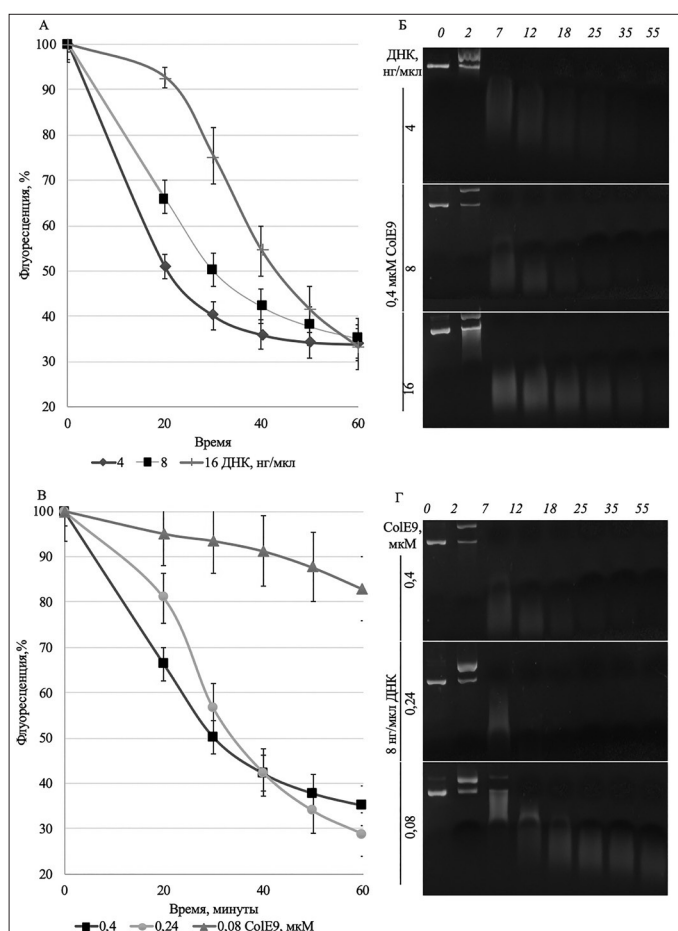


Рис. 5. Анализ ДНКазной активности колицина E9 на плазмидной ДНК в присутствии Eva Green. А, Б — реакцию проводили при концентрации колицина 0,24 мкМ и концентрациях плазмидной ДНК 4, 8 и 16 нг/мкл и анализировали по изменению флуоресценции (А) или электрофоретически (Б). В, Г — реакцию проводили при концентрациях колицина 0,4, 0,24 и 0,08 мкМ и концентрациях плазмидной ДНК 8 нг/мкл, и анализировали по изменению флуоресценции (В) или электрофоретически (Г)

выходом на плато к 50–60-й минутам при концентрации колицина 0,8 мкМ.

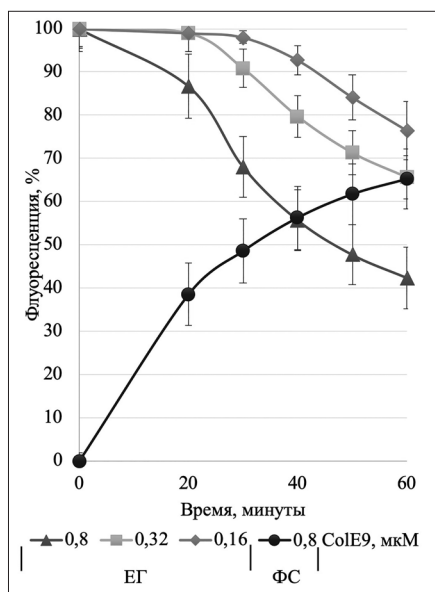


Рис. 6. Анализ ДНКазной активности колицина E9 на двунитевых олигонуклеотидах. Реакцию проводили в присутствии красителя Eva Green (EG) или флуоресцентно меченного субстрата (ФС). Концентрация колицина в реакции составляла 0,8, 0,32 или 0,16 мкМ в случае Eva Green и 0,8 мкМ для флуоресцентно-меченного субстрата

Колицин E9 вносит одонитевые разрывы в ДНК. Накопление значительного количества одонитевых разрывов приводит к высвобождению интеркалирующего красителя вследствие формирования одонитевой ДНК и коротких двунитевых фрагментов/участков ДНК, к которым сродство Eva Green существенно ниже [19]. Очевидно, что незначительное количество одонитевых разрывов может и не приводить к плавлению ДНК в условиях реакции (30 °С) и, как следствие, к падению сигнала флуоресценции. Было решено проанализировать наличие «скрытых» разрывов в ДНК, для чего провели плавление продуктов гидролиза после 60 минут обработки ДНКазой при 60 и 90 °С: температура 60 °С ниже расчетной температуры плавления субстратной ДНК, тогда как прогрев до 90 °С будет сопровождаться полным ее плавлением, высвобождением красителя Eva Green и снижением сигнала флуоресценции до фонового уровня.

Во всех случаях инкубация субстрата при 90 °С приводила к более чем шестикратному снижению флуоресцентного сигнала (рис. 7). При 60 °С для контрольного образца падение флуоресцентного сигнала наблюдалось менее чем в два раза. Тогда как в образцах,

обработанных ДНКазой, прогрев до 60 °С приводил к падению сигнала флуоресценции почти до фонового значения. Полученные результаты демонстрируют возможность детектировать «скрытые» разрывы и, тем самым, существенно повысить чувствительность метода. Наиболее ярко это видно для образца с концентрацией колицина 0,16 мкМ, в котором снижение сигнала флуоресценции после инкубации с ферментом было незначительным, а после прогрева до 60 °С значение флуоресцентного сигнала почти не превышало фоновую флуоресценцию Eva Green.

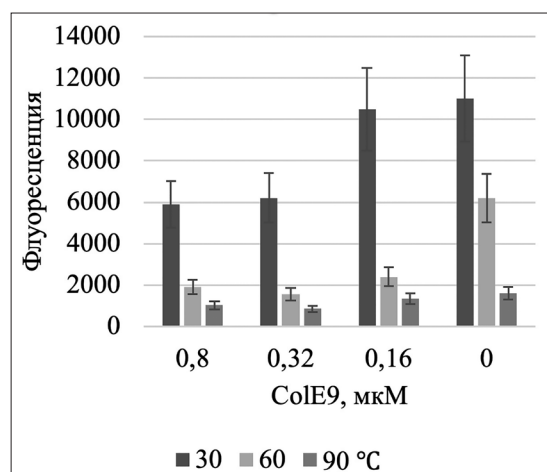


Рис. 7. Анализ флуоресценции реакционной смеси при различных температурах. Реакцию гидролиза проводили на олигонуклеотидном субстрате в присутствии Eva Green в течение 60 минут при 30 °С. Затем измеряли флуоресценцию либо при температуре реакции (30 °С), либо в образцах, прогретых до 60 и 90 °С

Заключение

В данной работе предложен простой, воспроизводимый метод детекции неспецифической ДНКазной активности в присутствии интеркалирующего красителя Eva Green. В качестве неспецифической ДНКазы использовали колицин E9 *Escherichia coli*. Было показано, что Eva Green незначительно ингибирует активность колицина E9 и, благодаря своей фотостабильности, он пригоден для определения ДНКазной активности. Использование интеркалирующего красителя в комбинации с олигонуклеотидным субстратом делает метод детекции ДНКазы достаточно чувствительным и дешевым.

Данное исследование было выполнено при поддержке Фонда содействия инноваций по программе «УМНИК. НТИ-Хелснет» договор №16248ГУ/2021.

Литература

1. Черепанова А.В., Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П. Активность дезоксирибонуклеаз крови в норме и при патологии // Биомедицинская химия. — 2007. — Т. 53. — № 5. — С. 488–496.
2. Chaudhuri P., Singh S.D. Modified methods for simple and rapid detection of bacterial deoxyribonuclease production // J. Microbiol. Methods. Elsevier. — 1992. — P. 16. — No. 4. — P. 307–311.
3. Choi S.J., Szoka F.C. Fluorometric determination of deoxyribonuclease I activity with PicoGreen // Anal. Biochem. — 2000. — Vol. 281. — No. 1. — P. 95–97.
4. Christie E.L., Dawson S.-J., Bowtell D.D.L. Special lecture blood worth bottling: Circulating tumor DNA as a cancer biomarker // Cancer Res. — 2016. — Vol. 76. — No. 19. — P. 5590–5591.
5. Cunningham L., Catlin B.W., De Garilhe M.P. A Deoxyribonuclease of *Micrococcus pyogenes* // J. Am. Chem. Soc. — 1956. — Vol. 78. — No. 18. — P. 4642–4645.
6. Garinot-Schneider C. et al. Identification of putative active-site residues in the DNase domain of colicin E9 by random mutagenesis // J. Mol. Biol. — 1996. — Vol. 260. — No. 5. — P. 731–742.
7. Gerceker D. et al. A new, simple, rapid test for detection of DNase activity of microorganisms: DNase Tube test // J. Gen. Appl. Microbiol. — 2009. — Vol. 55. — No. 4. — P. 291–294.
8. Jeffries C.D., Holtman D.F., Guse D.G. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids // J. Bacteriol. — 1957. — Vol. 73. — No. 4. — P. 590–591.
9. Kunitz M. Crystalline desoxyribonuclease; isolation and general properties; spectrophotometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity // J. Gen. Physiol. — 1950. — Vol. 33. — No. 4. — P. 349–362.
10. Mao F., Leung W.Y., Xin X. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications // BMC Biotechnol. — 2007. — Vol. 7. — Art. 76. doi: 10.1186/1472-6750-7-76.
11. Mozioglu E. et al. Oligomer based real-time detection of microorganisms producing nuclease enzymes // Analyst. — 2019. — Vol. 144. — No. 4. — P. 1379–1385.
12. Pimenta F.P. et al. DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae* // Lett. Appl. Microbiol. — 2008. — Vol. 46. — No. 3. — P. 307–311.
13. Rothberg N.W., Swartz M.N. Extracellular deoxyribonucleases in members of the family *Enterobacteriaceae* // J. Bacteriol. American Society for Microbiology (ASM). — 1965. — Vol. 90. — No. 1. — P. 294–295.
14. Shaw J.-P. et al. Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum // Nucleic Acids Research. — 1991. — Vol. 19. — No. 4. — P. 747–750.
15. Sinicropi D. et al. Colorimetric determination of DNase I activity with a DNA-methyl green substrate // Anal. Biochem. — 1994. — Vol. 222. — No. 2. — P. 351–358.
16. Smith P.B., Hancock G.A., Rhoden D.L. Improved medium for detecting deoxyribonuclease-producing bacteria // Appl. Microbiol. — 1969. — Vol. 18. — No. 6. — P. 991–993.
17. Tamkovich S.N. et al. Circulating DNA and DNase activity in human blood // Annals of the New York Academy of Sciences. — 2006. — Vol. 1075. — P. 191–196.
18. Waller J.R., Hodel S.L., Almquist D.B. An evaluation of five techniques used to detect deoxyribonuclease production by bacteria // J. Microbiol. Methods. Elsevier. — 1985. — Vol. 3. — No. 5–6. — P. 303–309.
19. Waller J.R., Hodel S.L., Nuti R.N. Improvement of two toluidine blue O-mediated techniques for DNase detection // J. Clin. Microbiol. — 1985. — Vol. 21. — No. 2. — P. 195–199.
20. Zhou Z. et al. A graphene-based real-time fluorescent assay of deoxyribonuclease I activity and inhibition // Anal. Chim. Acta. Elsevier. — 2012. — Vol. 740. — P. 88–92.

References

1. Cherepanova AV, Tamkovich SN, Vlasov VV, Laktionov PP. Aktivnost' dezoksiribonukleaz krvi v norme i pri patologii. Biomeditsinskaya khimiya 2007; 53(5):488–496 (in Russian).
2. Chaudhuri P, Singh SD. Modified methods for simple and rapid detection of bacterial deoxyribonuclease production. J Microbiol Methods Elsevier 1992;16(4):307–311.
3. Choi SJ, Szoka FC. Fluorometric determination of deoxyribonuclease I activity with PicoGreen. Anal Biochem 2000; 281(1):95–97.
4. Christie EL, Dawson S-J, Bowtell DDL. Special lecture blood worth bottling: Circulating tumor DNA as a cancer biomarker. Cancer Res 2016; 76(19):5590–5591.
5. Cunningham L, Catlin BW, De Garilhe MP. A Deoxyribonuclease of *Micrococcus pyogenes*. J Am Chem Soc 1956; 78(18):4642–4645.
6. Garinot-Schneider C et al. Identification of putative active-site residues in the DNase domain of colicin E9 by random mutagenesis. J Mol Biol 1996; 260(5):731–742.
7. Gerceker D et al. A new, simple, rapid test for detection of DNase activity of microorganisms: DNase Tube test. J Gen Appl Microbiol 2009; 55(4):291–294.
8. Jeffries CD, Holtman DF, Guse DG. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. J Bacteriol 1957; 73(4):590–591.
9. Kunitz M. Crystalline desoxyribonuclease; isolation and general properties; spectrophotometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity. J Gen Physiol 1950; 33(4):349–362.
10. Mao F, Leung WY, Xin X. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. BMC Biotechnol 2007; 7:76. doi: 10.1186/1472-6750-7-76.

11. Mozioglu E et al. Oligomer based real-time detection of microorganisms producing nuclease enzymes. *Analyst* 2019; 144(4):1379–1385.
12. Pimenta FP et al. DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*. *Lett Appl Microbiol* 2008; 46(3): 307–311.
13. Rothberg NW, Swartz MN. Extracellular deoxyribonucleases in members of the family Enterobacteriaceae. *J Bacteriol American Society for Microbiology (ASM)* 1965; 90(1):294–295.
14. Shaw J-P et al. Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum. *Nucleic Acids Research* 1991; 19(4):747–750.
15. Sinicropi D et al. Colorimetric determination of DNase I activity with a DNA-methyl green substrate. *Anal Biochem* 1994; 222(2):351–358.
16. Smith PB, Hancock GA, Rhoden DL. Improved medium for detecting deoxyribonuclease-producing bacteria. *Appl Microbiol* 1969; 18(6):991–993.
17. Tamkovich SN et al. Circulating DNA and DNase activity in human blood. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 1075:191–196.
18. Waller JR, Hodel SL, Almquist DB. An evaluation of five techniques used to detect deoxyribonuclease production by bacteria. *J Microbiol Methods Elsevier* 1985; 3(5)–6:303–309.
19. Waller JR, Hodel SL, Nuti RN. Improvement of two toluidine blue O-mediated techniques for DNase detection. *J Clin Microbiol* 1985; 21(2):195–199.
20. Zhou Z et al. A graphene-based real-time fluorescent assay of deoxyribonuclease I activity and inhibition. *Anal Chim Acta Elsevier* 2012; 740:88–92.

DNASE ACTIVITY ASSAY IN THE PRESENCE OF INTERCALATING DYE

D.S. KALININ¹, P.V. EVTEHOVA², L.G. MALAEV³, M.A. EREMINA³,
S.G. MAYOROV⁴, M.G. SHLYAPNIKOV⁴, I.E. GRANOVSKY^{1,4}

¹ *The Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences, Moscow;* ² *Tula State University, Tula;* ³ *Lomonosov Moscow State University, Moscow;* ⁴ *Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region.*

The DNase activity test is known as an assay to identify pathogenic microorganisms, and in the diagnostic of cancer and autoimmune diseases. In this work, we proposed a simple, reproducible technique for the detection of nonspecific DNase activity in the presence of the intercalating dye Eva Green. *Escherichia coli* colicin E9 was used as an example of nonspecific DNase, and plasmid DNA and double-stranded oligonucleotides were employed as a substrate. Degradation of the substrates was accompanied and quantified by a decrease in the fluorescence signal that was detected by real-time analysis. The assay time ranged from 20 to 60 minutes, depending on DNase concentration. Melting the reaction products at 60 °C increases the sensitivity and reduces the analysis time.

Keywords: DNase activity test, colicin E9, oligonucleotides, intercalating dye.

Address:

Kalinin D.S.
Junior researcher, laboratory of molecular biotechnology,
Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology»
of the Russian Academy of Sciences
E-mail: 309163@gmail.com

Для цитирования:

Калинин Д.С., Евтехова П.В., Малаев Л.Г., Еремина М.А., Майоров С.Г., Шляпников М.Г., Грановский И.Э. Метод определения ДНКазной активности в присутствии интеркалирующего красителя. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2023; 19(2):54–61.

For citation:

Kalinin D.S., Evtchova P.V., Malaev L.G., Eremina M.A., Mayorov S.G., Shlyapnikov M.G., Granovsky I.E. DNase activity assay in the presence of intercalating dye. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2023; 19(2):54–61 (in Russian).

ВАРИАНТ РЕАЛИЗАЦИИ СИСТЕМЫ ЛАБОРАТОРНОЙ УСТАНОВКИ ПЕРФУЗИОННОЙ ФИЛЬТРАЦИИ ДЛЯ НЕПРЕРЫВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КУЛЬТУР КЛЕТОК

О.О. КАРПОВА*, И.Н. МАТВЕЕВА

*Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности,
г/о Лосино-Петровский, Московской область*

В обзорной статье описывается лабораторная система перфузионной фильтрации для непрерывного культивирования культур клеток. Рассмотрены некоторые данные о способах получения вакцин методом перфузионной фильтрации и культивирование культур клеток на основе перфузии. Приведенное описание позволяет получить общее представление о возможностях применения способа перфузионной фильтрации для непрерывного культивирования культур клеток в лабораторном масштабе.

Ключевые слова: перфузионный процесс, перфузионная фильтрация, перфузия, непрерывное культивирование клеток.

Введение

Перфузионный процесс становится все более популярным способом для производства продуктов точного культивирования, таких как моноклональные антитела, терапевтические белки, вакцины и др. [5]. Данная система фильтрации обладает рядом преимуществ по сравнению с периодическим и полупериодическим режимами культивирования. Самые явные — снижение капитальных затрат и способность поддерживать более высокую плотность культуры клеток с обеспечением определенного уровня жизнеспособности в течение более длительного времени [1]. Перфузионный процесс наиболее востребован для биотехнологических компаний, имеющих сжатые сроки производственного процесса культивирования в промышленных масштабах. Помимо этого, применение установок рассматриваемой системы фильтрации в лабораторных масштабах также может показать свою эффективность, потому что это позволяет достичь многих специфических характеристик культуры, полученной непрерывным методом, например: высокая плотность клеток, большой выход продукта, что, в свою очередь, приведет к повышению производительности [2]. Однако на данный момент было опубликовано мало примеров устройств, способных оптимизировать перфу-

зионные процессы высокой плотности клеток в малых масштабах и/или с высокой пропускной способностью. Учитывая все это, нами было рассмотрен вариант реализации и возможность внедрения установки лабораторного масштаба.

Как известно, суть перфузионного процесса заключается в том, что новая среда постоянно добавляется в биореактор с клетками, а отработанная в этот момент постоянно собирается. В результате состав питательной среды для культивирования клеток остается достаточно стабильно статичным в течение всего процесса [3]. Поскольку состав среды может влиять на метаболизм клеток и, следовательно, на характеристики продукта, то, чем более постоянны условия процесса, тем более стабильным может быть качество продукта. На данный момент биотехнологические компании выступают за внедрение непрерывного способа культивирования, и рынок отражает потребность во внедрении данного метода [12]. Несмотря на то, что культура клеток требует большого количества свежей питательной среды, объемный прирост производительности, то есть количество продукта, произведенного в объеме культуры и за определенное время, значительно выше и перевешивает увеличение затрат на среду и стерилизацию. Улучшение параметров сводится к оптимизации состава среды для обеспечения того, чтобы объем питательной среды в день был минимальным.

Рассмотрим способ внедрения лабораторной установки перфузионной фильтрации в производственный процесс. На рисунке 1 показана функциональная схема работы лабораторной установки перфузионной фильтра-

© 2023 г. Карпова О.О., Матвеева И.Н.

* Автор для переписки:

Карпова Ольга Олеговна

аспирант, м.н.с., Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности

E-mail: vnitibp@mail.ru, rumolga98@mail.ru

ции. Как видно, продукты, проходящие через устройство для удержания клеток, непрерывно собираются.

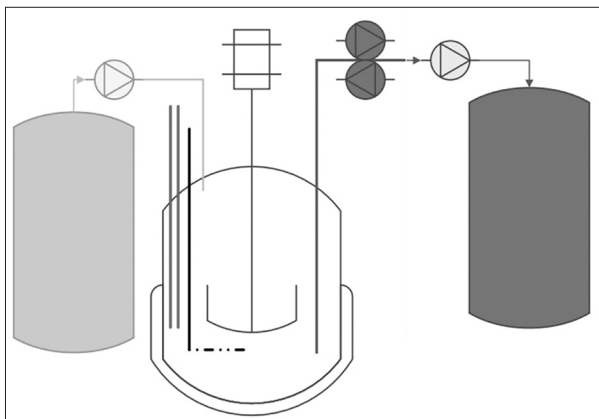


Рис. 1. Функциональная схема работы лабораторной установки перфузионной фильтрации

На рисунке 1 представлены необходимые компоненты для работы лабораторной установки перфузии. Двойной чертой показаны датчики рН и DO, черным изображена линия для подачи газов. Светлой чертой помечена рубашка вокруг емкости для свежей среды, стрелкой — отработанная среда. В устойчивом состоянии во время перфузии клеточные культуры достигают определенной плотности клеток при постоянных параметрах, таких как скорость потока среды, жизнеспособность клеток, уровень рН, O_2/CO_2 и температура. При поддержании данных показателей на протяжении всего цикла культивирования ожидается, что клетки будут стабильно генерировать постоянный выход продукта, постепенно наращивая концентрацию и плотность.

Помимо использования для производства секретлируемых белков или вирусных векторов, перфузия может применяться на более ранних этапах некоторых биопроцессов, например, при производстве посевных составов высокой плотности или для достижения высокой плотности клеток для производства вирусных векторов. Лабораторная установка может применяться для получения вакцин. Например, был разработан новый процесс перфузионного производства рекомбинантной аденовирусной вакцины против опоясывающего лишая, который привел к повышению концентрации клеток и объемной производительности, что позволило стать широко используемой стратегией в производстве вакцин [6].

Некоторые исследователи проводили перфузионное культивирование культур клеток СНО в 5-литровом биореакторе и достигли, по некоторым источникам, $23,4 \times 10^6$ клеток $мл^{-1}$ на 7-й день [12]. Пример такой реализации приведен на рисунке 2.

Также рассматривался вариант создания установки для перфузии, с фильтром TFF в качестве устройства для удержания клеток [7]. Принцип функционирования такой системы представлен на рисунке 3 (производитель CYTIVA).

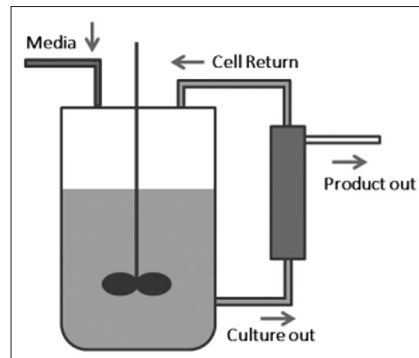


Рис. 2. Функциональная схема работы перфузии (тангенциальная фильтрация)

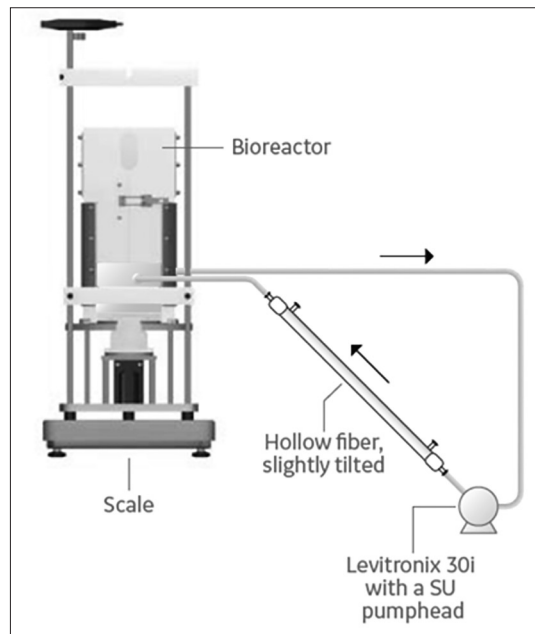


Рис. 3. Перфузионная установка с системой биореакторов CYTIVA, с использованием TFF в качестве метода удержания клеток

На рисунке 4 представлен еще один вариант перфузии. С помощью нее была достигнута концентрация $2,14 \times 10^8$ клеток/мл. При использовании этой установки плотность клеток была ограничена пропускной способностью мембраны для встречающейся высокой вязкости и уровнем pCO_2 , P1, P2 и P3 — индикаторы давления HF на входе HF, пермеата и ретентата, соответственно. На схеме представлены системы ATF- и TFF в лаборатории КТН: мешок с клеточной культурой (1), рециркуляционный насос (2), HF (3), ATF (4) и погружная трубка (5) [4].

На рисунке 5 показан схематический вид сбоку модели перфузии непрерывной ферментации мембранного типа, приведенной в патенте США [10]. Как изображено на рисунке 5, непрерывный ферментационный аппарат оснащен ферментером 1, разделительным

мембранным модулем 2 и трубами для соединения между ферментером 1 и разделительным мембранным модулем 2. Ферментер и модуль разделительной мембраны соединены друг с другом, образуя систему циркуляции.

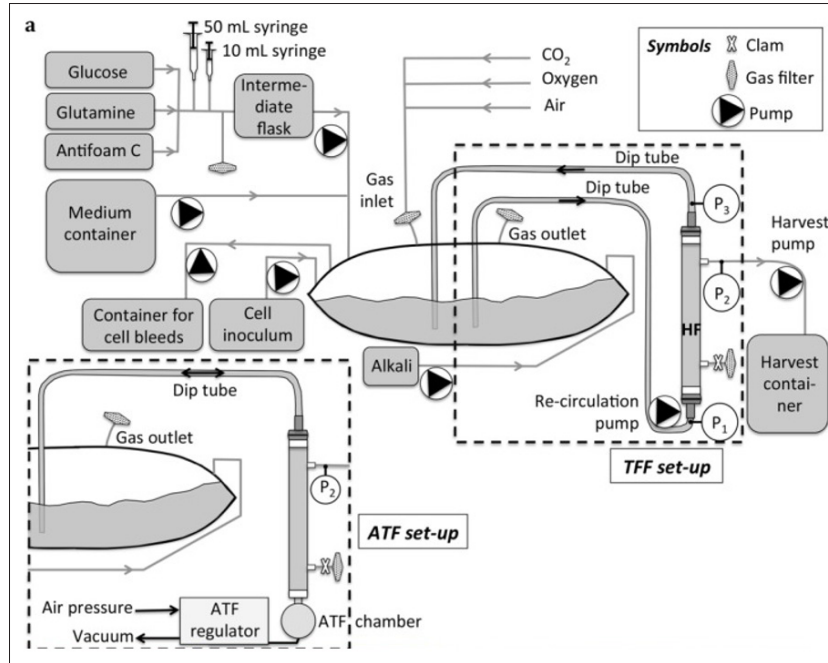


Рис. 4. Схема TFF- и ATF-перфузии

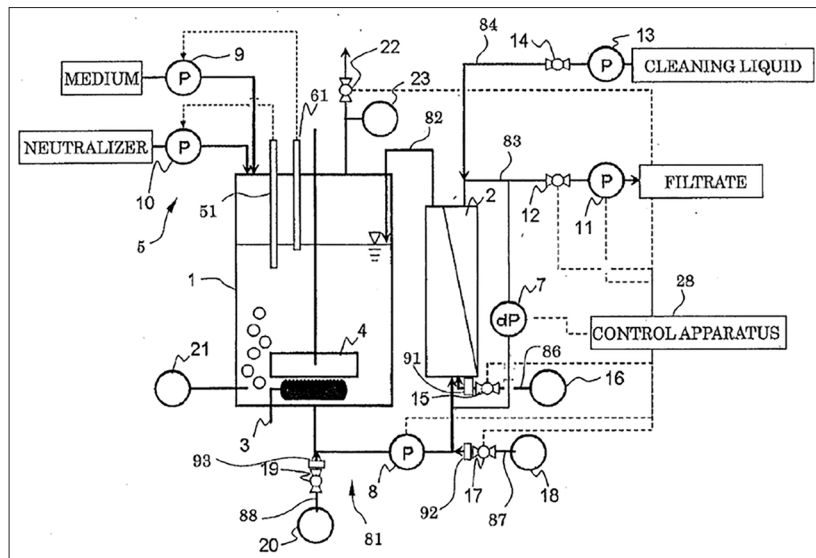


Рис. 5. Схема перфузии в патенте США US 2013 0330787A1

Реализация идеи лабораторной установки перфузии представлена на рисунке 6. Идея состояла в предложении реализовать лабораторную перфузию на электромагнитных клапанах (8, 9, 10). Нами было предложено использовать одни весы (1) для фиксации объема питательной среды на входе в биореактор (4) и другие весы на выходе для измерения объема отра-

ботанной питательной среды (12). Используются два перистальтических насоса (3 и 5). Насос 3 обеспечивает автоматическое поступление питательной среды в биореактор. Насос 5 обеспечивает подачу среды с клетками через фильтр (6). Давление (7) регулируется с помощью компрессора, значения передаются на панель оператора (ПЛК).

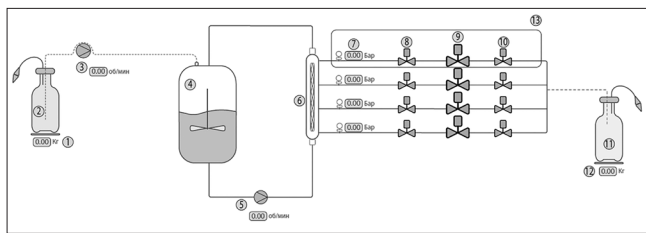


Рис. 6. Схема лабораторной установки для отработки перфузионной фильтрации

Заключение

Таким образом, при анализе информации, учитывающая мировую тенденцию, мы видим, что вопрос создания лабораторной установки перфузионной фильтрации является актуальным. Проведя анализ опубликованных образцов данного типа оборудования, нами был предложен ряд вариантов, который сможет также реализовать преимущества указанной системы фильтрации. Дальнейшие исследования будут направлены на техническую проработку схемы, создания прототипа и проведение эксперимента в лабораторных условиях для оценки ее эффективности.

Литература

1. Карпова О.О., Матвеева И.Н. Культивирование клеток: сравнительный анализ традиционных и инновационных технологий // *Ветеринарный врач*. — 2022. — № 5. — С. 14–18.
2. Bielser J.M., Chappuis L., Xiao Y. et al. Perfusion cell culture for the production of conjugated recombinant fusion proteins reduces clipping and quality heterogeneity compared to batch-mode processes // *J. Biotechnol.* — 2019. — Vol. 302. — P. 26–31.
3. BioMarin Pharmaceutical 2017. N., United States. Automated High Throughput Cell Culture Methods for the Development and Investigation of Large Scale Perfusion Processes — Poster 142. Paper presented at the The 25th Annual Meeting of the European Society of Animal Cell Technology, Lausanne.
4. Clincke M.F., Mölleryd C., Zhang Y., Lindskog E., Walsh K., Chotteau V. Very high density of CHO cells in perfusion by ATF or TFF in WAVE bioreactor™. Part I. Effect of the cell density on the process // *Biotechnol Prog.* — 2013. — Vol. 29. — No. 3. — P. 754–767.
5. Hein M.D., Chawla A., Cattaneo M., Kupke S.Y., Genzel Y., Reichl U. Cell culture-based production of defective interfering influenza A virus particles in perfusion mode using an alternating tangential flow filtration system // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2021. — Vol. 105. — No. 19. — P. 7251–7264.

6. Nie J., Sun Y., Feng K., Huang L., Li Y., Bai Z. The efficient development of a novel recombinant adenovirus zoster vaccine perfusion production process // *Vaccine*. — 2022. — Vol. 40. — No. 13. — P. 2036–2043.
7. Perfusion bioreactor with TFF cell retention: [Электронный ресурс]. URL: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/solutions/bioprocessing/knowledge-center/perfusion-culture-tff-cell-retention>. (Дата обращения: 10.02.2023).
8. Pollock J., Ho S.V., & Farid S.S. Fed-batch and perfusion culture processes: Economic, environmental, and operational feasibility under uncertainty // *Biotechnology and Bioengineering*. — 2013. — Vol. 110. — No. 1. — P. 206–219.
9. Qin Y., Ma R., Li Y., Li Y., Chen G., Zhou W. Productivity and quality improvement for a symmetric bispecific antibody through the application of intensified perfusion cell culture // *Antibody Therapeutics*. — 2022. — Vol. 5. — Issue 2. — P. 111–120.
10. Satoko Kanamori, Shiga (JP); Jihoon Cheon, Shiga (JP); Takashi Mimitsuka, Kanagawa (JP); Norihiro Takeuchi, Shiga (JP); Makoto Nishida, Shiga (JP); Yuji Tanaka, Shiga (JP). United States Patent Application Publication: US 2013/0330787 A1. Method for producing chemical by continuous fermentation. Dec. 12, 2013.
11. Sewell D.J. The biological impact of high throughput continuous bioprocessing. — Apollo — University of Cambridge Repository 2020; doi:10.17863/CAM.58800.
12. Tregidgo M.B. Scale-down technologies for perfusion culture for rapid biopharmaceutical process development. Doctoral thesis (Eng.D), UCL (University College London), 2022.

References

1. Karpova OO, Matveyeva IN. Kul'tivirovaniye kletok: sravnitel'nyy analiz traditsionnykh i innovatsionnykh tekhnologiy. *Veterinarnyy vrach* 2022; 5:14–18 (in Russian).
2. Bielser JM, Chappuis L, Xiao Y et al. Perfusion cell culture for the production of conjugated recombinant fusion proteins reduces clipping and quality heterogeneity compared to batch-mode processes. *J Biotechnol* 2019; 302:26–31.
3. BioMarin Pharmaceutical 2017. N., United States. Automated High Throughput Cell Culture Methods for the Development and Investigation of Large Scale Perfusion Processes — Poster 142. Paper presented at the The 25th Annual Meeting of the European Society of Animal Cell Technology, Lausanne.
4. Clincke MF, Mölleryd C, Zhang Y, Lindskog E, Walsh K, Chotteau V. Very high density of CHO cells in perfusion by ATF or TFF in WAVE bioreactor™. Part I. Effect of the cell density on the process. *Biotechnol Prog* 2013; 29(3):754–767.
5. Hein MD, Chawla A, Cattaneo M, Kupke SY, Genzel Y, Reichl U. Cell culture-based production of defective interfering influenza A virus particles in perfusion mode using an alternating tangential flow filtration system. *Appl Microbiol Biotechnol* 2021; 105(19):7251–7264.

6. Nie J, Sun Y, Feng K, Huang L, Li Y, Bai Z. The efficient development of a novel recombinant adenovirus zoster vaccine perfusion production process. *Vaccine* 2022; 40(13):2036–2043.
7. Perfusion bioreactor with TFF cell retention: [Электронный ресурс]. URL: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/solutions/bioprocessing/knowledge-center/perfusion-culture-tff-cell-retention>. (Дата обращения: 10.02.2023).
8. Pollock J, Ho SV, & Farid SS. Fed-batch and perfusion culture processes: Economic, environmental, and operational feasibility under uncertainty. *Biotechnology and Bioengineering* 2013; 110(1):206–219.
9. Qin Y, Ma R, Li Y, Li Y, Chen G, Zhou W. Productivity and quality improvement for a symmetric bispecific antibody through the application of intensified perfusion cell culture. *Antibody Therapeutics* 2022; 5(2):111–120.
10. Satoko Kanamori, Shiga (JP); Jihoon Cheon, Shiga (JP); Takashi Mimitsuka, Kanagawa (JP); Norihiro Takeuchi, Shiga (JP); Makoto Nishida, Shiga (JP); Yuji Tanaka, Shiga (JP). United States Patent Application Publication: US 2013/0330787 A1. Method for producing chemical by continuous fermentation. Dec. 12, 2013.
11. Sewell DJ. The biological impact of high throughput continuous bioprocessing. *Apollo – University of Cambridge Repository* 2020; doi:10.17863/CAM.58800.
12. Tregidgo MB. Scale-down technologies for perfusion culture for rapid biopharmaceutical process development. Doctoral thesis (Eng.D), UCL (University College London), 2022.

A VARIANT IMPLEMENTATION OF A LABORATORY PERFUSION FILTRATION SYSTEM FOR CONTINUOUS CULTIVATION OF CELL CULTURES

O.O. KARPOVA, I.N. MATVEEVA

*All-Russian Scientific Research and Technological Institute of the Biological Industry,
Urban District Losino-Petrovsky, Moscow Region*

This article describes a perfusion system for continuous cell cultivation. A laboratory model of a perfusion is considered. Some data on the method of vaccine production by perfusion filtration and perfusion-based culturing of CHO cell cultures are considered. The description gives an overview of the possibilities of using the perfusion cultivation for continuous cell culture on a laboratory scale.

Keywords: perfusion process, continuous cultivation, perfusion filtration, perfusion, cell cultivation.

Address:

Karpova O.O.
postgraduate student, junior researcher, All-Russian
Scientific Research and Technological Institute
of Biological Industry
E-mail: vnitibp@mail.ru, rumolga98@mail.ru

Для цитирования:

Карпова О.О., Матвеева И.Н. Вариант реализации системы лабораторной установки перфузионной фильтрации для непрерывного культивирования культур клеток. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2023; 19(2):62–66.

For citation:

Karpova O.O., Matveeva I.N. A variant implementation of a laboratory perfusion filtration system for continuous cultivation of cell cultures. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2023; 19(2):62–66 (in Russian).

ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ОПТИМИЗАЦИИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ НА ОСНОВЕ ВИДЕОЦИФРОВОГО АНАЛИЗА (ОБЗОР)

Д.М. ФРОЛОВ*, Т.В. ЗАМАРИНА, Е.В. ПИМЕНОВА, А.В. ЕЛХОВА, А.Т. ЯКОВЛЕВ

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград

Видеоцифровая регистрация (ВЦР) является эффективным автоматизированным средством фиксации результатов иммунохимических тестов в лабораторной диагностике. С ее помощью возможны получение и сохранение первичного изображения данных и достижение высокой объективности оценки результатов анализа за счет применения программных средств обработки результатов. Сохранение полученных данных обеспечит возможность ретроспективно оценивать и контролировать возможные ошибки, сопоставляя результаты с показателями повторных и дублирующих анализов.

Ключевые слова: лабораторная диагностика, цифровизация, видеоцифровая регистрация, обзоры.

Введение

В последние годы в лабораторной диагностике все более широко используется получение аналитической информации с помощью устройств на основе видеоцифровых камер или сканеров [31–35]. Сфера применения таких устройств для лабораторных исследований постоянно расширяется благодаря улучшению характеристик выпускаемых приборов, разработкам новых технологических решений и пакетов программного обеспечения. Термин «видеоцифровая регистрация» для определения технологии регистрации результатов лабораторных исследований был введен группой исследователей Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта и Института биохимии им. А.Н. Баха РАН [2–4, 10, 23, 25, 36]. Востребованность ВЦР как направления развития лабораторной диагностики определяется следующими факторами: наличие большого количества упрощенных методов и тестов, предназначенных для серийных исследований, в частности — методика агглютинации; развитие лабораторных технологий для выполнения анализа в полевых условиях, например, при работе в диагностических лабораториях в специализированных противочумных бригадах (СПЭБ); современные требования к передаче и хра-

нению информации в электронном виде; масштабное внедрение лабораторных компьютерных сетей [5, 7, 8, 10, 11, 27].

Применение современных полностью автоматизированных систем сегодня ограничено тем, что они эффективны и экономически целесообразны только в условиях крупных централизованных диагностических лабораторий. Малые и средние лаборатории оснащаются узкоспециализированными приборами, одновременно в этих лабораториях используется значительное число исследований, где учет результатов проводится визуально. К ним относятся, прежде всего, агглютинационные тесты (реакция коаггутинации (КОА), реакция латекс-агглютинации (РЛА), реакция пассивной гемагглютинации (РПГА)), дот-анализ и др. [12, 20, 25].

Для повышения аналитической надежности и массового применения в бактериологических и вирусологических лабораториях иммунологических тестов с визуальной регистрацией, таких как РЛА, РПГА, реакция торможения гемагглютинации (РТГА), перспективным представляется использование в качестве устройств, регистрирующих результаты реакции, современных видеоцифровых технологий и систем видеоцифрового анализа (ВЦА) с соответствующим программным обеспечением, которые предоставляют возможность объективизации полученной информации, документирования данных и проведения внутрилабораторного контроля качества (ВЛКК) [1, 14, 16, 18].

Данная обзорная статья посвящена описанию возможностей и перспектив для использования и оптимизации лабораторных иммунологических тестов в бактериологии и вирусологии на основе ВЦА.

© 2023 г. Фролов Д.М., Замарина Т.В., Пименова Е.В., Елхова А.В., Яковлев А.Т.

* Автор для переписки:

Фролов Дмитрий Михайлович

н.с. лаборатории иммунологии, ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

E-mail: frodm86@yandex.ru

Общая характеристика метода ВЦР

Методы с использованием принципов фотометрии широко применяются в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний для регистрации результатов реакции, например, в иммуноферментном анализе (ИФА). Однако существует множество диагностических тестов, где традиционная фотометрия неприемлема. Это — лабораторные методы, где в результате реакции изменяется структура объектов исследуемых компонентов, поэтому результаты подобных исследований учитываются визуально (КОА, РЛА, РПГА). Именно такие лабораторные методы исследования являются пространством, где технологии и подходы ВЦР особенно перспективны [14, 28, 29, 30].

На рисунке 1 представлена принципиальная схема, иллюстрирующая возможности технологии ВЦР, описанные ранее рядом исследователей, в сопоставлении с традиционными сравнительными методами [11, 21, 24, 25].

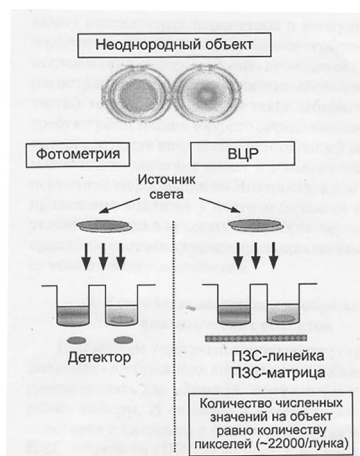


Рис. 1. Сопоставление возможностей технологии видеоцифровой регистрации с фотометрией для однородных и неоднородных лабораторных объектов [21]

Как иллюстрирует рисунок 1, система ВЦР дает возможность получить изображение образца, представляющего собой совокупность сигналов, отвечающих большому количеству точек выбранного объекта. Для неоднородных объектов наличие большого объема цифровой информации позволяет охарактеризовать определяемую дисперсию с последующим представлением результатов: делает возможным установление наличия артефактов в изучаемом образце, либо плотности неоднородной массы объекта исследования, которая формируется в результате взаимодействия антигена, антитела и их носителя.

В качестве компонентов системы ВЦР используются следующие элементы:

1. Регистрирующий элемент типа CCD (Charge-coupled device) — универсальная камера для видеоконфе-

ренций, которая подключена к компьютеру через USB-solo порт, изображение затем сохраняется в нужном формате файлов и в необходимом количестве цветных оттенков.

2. Система освещения смонтированных в держателях нескольких светодиодов.

3. Корпус для электромонтажных работ.

В настоящее время для полной портативности прибора разработаны и используются бескорпусные регистраторы уменьшенных размеров [5, 7, 10, 21].

В качестве регистрирующего устройства для получения изображения используют сканеры, где в роли чувствительного элемента применяются приборы с зарядовой связью (ПЗС) — линейки и устройства с CCD-камерами. Сканеры в настоящее время производятся в массовом количестве, доступны по цене, дают изображение высокого разрешения и пригодны для работы с плоскими объектами.

Для применения в качестве регистрирующего устройства результатов лабораторных тестов видеорегистратор должен обеспечивать следующие условия: регистрацию оптического сигнала во всем диапазоне длин волн видимой области через 5–10 с, хранение изображения в виде файла с возможностью распечатки изображения на бумаге и количественный отчет результатов с компьютерным расчетом и выводом данных.

Отечественные видеоцифровые системы

На рисунке 2 показаны отечественные видеоцифровые системы типа «Эксперт-Лаб» на основе фотосканера и несколько модификаций видеоцифровых систем «Рефлеком» на основе видеокамер. Каждое из регистрирующих устройств имеет свои достоинства и недостатки. Поэтому в зависимости от поставленных задач лабораторной диагностики могут применяться и другие системы [5, 13, 21, 22, 24, 26].

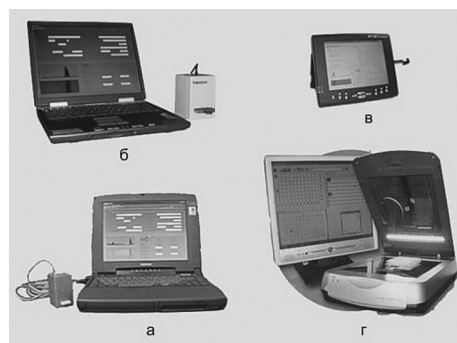


Рис. 2. Модификации регистрирующих видеоцифровых устройств на основе цифрового сканера и камеры: а) регистрирующая аппаратура на основе цифровой камеры «Рефлеком-Мини»; б) анализатор «Рефлеком» с компьютером «ноутбук»; в) «Рефлеком-компакт» (моноблок), г) система «Эксперт-Лаб» на основе сканера [21]

Несомненным преимуществом системы «Эксперт-Лаб» является возможность работы с распространенными лабораторными тестами, выполняемыми в 96-луночных планшетах; при этом изображения можно получить в режиме светопропускания, а затем вычислить аналитические параметры в каждой из 96 лунок планшета. ПЗС-камеры компактны, позволяют получать изображение с меньшим разрешением, но к тому же обеспечивают более высокую скорость съемки и тем самым дают возможность изготавливать малогабаритные мобильные и более универсальные, чем сканеры, приборы. Сейчас появились видеокамеры на комплементарной металл-оксид-полупроводниковой структуре (КМОП). Данная технология позволяет объединять на матрице различные устройства обработки информации и гарантирует выпуск значительно более дешевых и более доступных видеокамер [5, 7, 10, 24].

Вариант «Рефлеком-Мини» с накладным компьютером является компактным, портативным и предназначен для работы в полевых условиях; в частности, он перспективен для работы в мобильных лабораториях, например, СПЭБ. Все системы «Рефлеком» не нуждаются в подключении к электрической сети и могут питаться от батареи в автономном режиме [21].

Положительным свойством систем ВЦР представляется единообразие настройки и построения пользовательских интерфейсов и алгоритмов обработки информации, которые не зависят от типа устройства. Благодаря единым принципам построения программного обеспечения, а также удобным алгоритмам обработки информации в соответствии с характеристиками конечных результатов для конкретных типов реакций появилась возможность создать многофункциональные устройства, способные обеспечивать достоверную и объективную регистрацию результатов различных лабораторных исследований [5, 7, 10].

Старовойтовой Т.А. с соавт. в 2006 г. [24] были описаны результаты различных иммунохимических исследований, проводимых в формате 96-луночного планшета, таких как ИФА [6, 17, 19, 21, 25], РПГА [14, 18], РЛА [8, 9, 10, 15] на основе описанного выше сканерного аппаратно-программного комплекса «Эксперт-Лаб».

Все измерения проводились с получением изображения объектов в режиме проходящего света с дальнейшим расчетом оптической плотности (для варианта ИФА) или попиксельным анализом полученных изображений агглютинационных реакций для автоматической дискриминации результатов. Единый принцип построения пользовательских интерфейсов и система

представления информации продемонстрированы на примере окна программы для регистрации результатов РПГА (рис. 3).

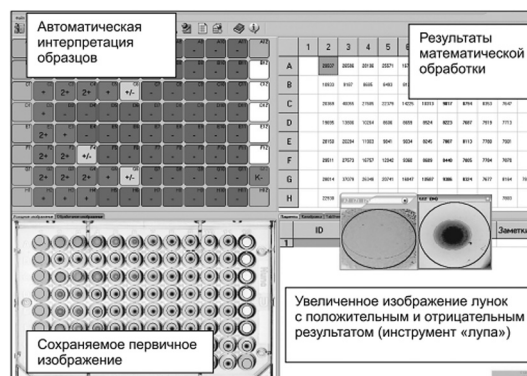


Рис. 3. Рабочее окно программы «Эксперт-Лаб-РПГА» [21]

В нижнем левом углу компьютерного окна (см. рис. 3) представлено сохраняемое первичное изображение результатов реакции, зафиксированное в определенный момент времени, заданный методикой. Интерфейс предполагает заполнение протокола для каждой серии исследований в виде автоматической интерпретации образцов и результатов математической обработки, для каждого отдельного тестирования задается расположение исследуемых образцов, контролей и калибраторов.

Для оценки выраженности РПГА применяются операции по повышению контрастности, бинаризации и сегментации изображения с последующим выделением самого большого контрастного объекта, для которого определяются размеры. На основании комбинации данных делается заключение об интенсивности РПГА [14, 18].

Для каждого конкретного типа иммунохимических реакций были разработаны специальные алгоритмы автоматической интерпретации результатов [21, 24].

Диагностические системы на основе агглютинационных тестов

Данные системы в настоящее время получили широкое распространение в лабораторной диагностике благодаря простоте и скорости проведения и учета анализа. Очевидные достоинства латекс-теста такие, как экспрессность и минимальные затраты реагентов, делают его привлекательным для малых и средних лабораторий [8, 9, 10, 15, 22, 23, 26].

Однако латекс-тесты имеют ряд существенных недочетов, обусловленных нестабильностью учета результатов реакции. Необходимость визуальной регистрации результатов через строго определенное время (3–15

мин) приводит к субъективности оценки результатов. Невозможность объективного учета результатов РЛА и сохранения протокола для последующих консультаций ограничивает ценность и сужает область применения латексных тестов [15].

Задачи по документированию результатов латекс-агглютинационных тестов в строго определенные временные интервалы и более объективной интерпретации результатов могут быть решены с помощью видеоцифровых систем. Изменение структуры объекта в результате реакции агглютинации фиксируется визуально (ВЦС) или с помощью приборов. При положительной реакции происходит переход от гомогенной субстанции (однородная мутная жидкость) к появлению зернистости, хлопьев или различных частиц комплексов в капле. Регистрирующий компонент видеоцифровой системы — сканер — позволяет получить изображение объекта с высокой степенью разрешения. После

сканирования и передачи изображения в компьютер специализированная программа анализа изображений («Эксперт-Лаб Агглютинация») обрабатывает сигналы именно от зон, соответствующих конкретным образцам. Алгоритм автоматического определения наличия или отсутствия агглютинации разработан с учетом особенностей протекания реакции латексной агглютинации. Более объективная оценка наличия и степени агглютинации визуально на экране дисплея возможна за счет программных средств обработки изображения. С помощью программы можно увеличить и контрастировать изображение одной или сразу нескольких лунок планшета, причем в случае необходимости изображение можно инвертировать. На рисунке 4 представлены результаты принципиальной обработки изображения программными средствами для визуального контроля результата анализа РЛА для каждого элемента матрицы индивидуально [8, 9, 15, 24, 26].

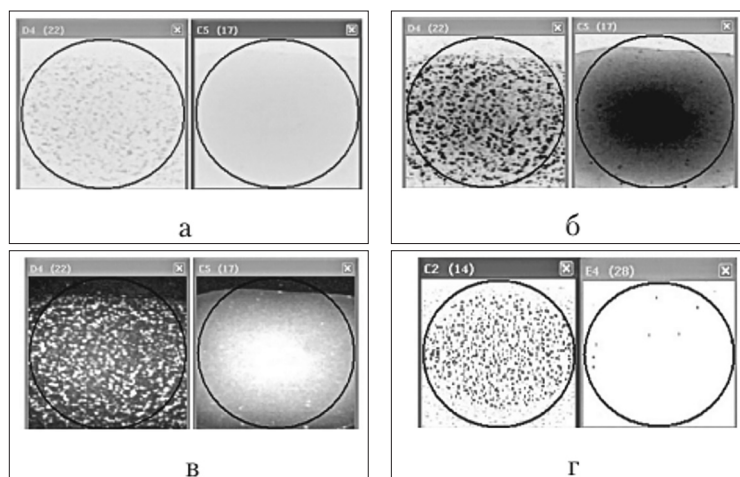


Рис. 4. Сравнение увеличенных изображений аналитических зон с наличием и отсутствием агглютинации в тестируемых сыворотках: первичное (а), контрастированное (б), инвертированное изображение (в) и визуальное аналоговое представление результатов после математической обработки (г) [15]

При сомнительной картине агглютинации увеличенные изображения аналитических зон с прореагировавшим реагентом есть возможность сравнить с располагаемыми рядом на экране компьютера увеличенными изображениями аналитических зон с контрольными образцами, чем достигается объективизация оценки результата реакции. Дополнительные возможности также предоставляет математическая обработка изображения [15, 21].

Сохранение изображения в цифровом формате обеспечивает ретроспективный контроль результатов, возможность консультаций с другими специалистами, выявление ошибок, связанных с «человеческим фактором». Безусловным преимуществом является наблюдение

за развитием процесса агглютинации во времени (получение временных рядов изображений).

Учет численной оценки выраженности агглютинации по количеству элементов в каждой зоне, их площадь и усредненная яркость дают возможность получения количественной оценки результата реакции агглютинации и определения порогового значения для дискриминации положительных и отрицательных образцов. Пороговое значение может быть задано как фиксированным числом, так и формулой, включающей в себя численные значения, соответствующие интенсивности агглютинации в зонах отрицательного и положительного контроля с выбираемыми оператором коэффициентами. Численная характеристика агглютинации обеспечивает дополнительную

информацию для принятия верного решения [7, 9, 10, 15, 20, 22, 24].

В случае РЛА полученное на сканере и сохраненное первичное изображение обрабатывается для контраста и выявления характерной зернистой структуры в зонах поиска. Далее путем преобразований получается бинарное изображение, которое содержит уже только отдельные контрастные элементы. Для цифровой оценки выраженности агглютинации учитывается количество элементов в анализируемой зоне, их контрастность, яркость и площадь [15, 21].

Еще одно положительное качество применения ВЦС — это миниатюризация применяемых тест-систем с целью экономии образцов биоматериала, реагентов без ущерба для аналитических характеристик систем [7, 9, 10, 24].

Дополнительные достоинства метода ВЦР

Дальнейшее снижение объемов реакционных смесей, естественно, требовало разработки соответствующих систем дозирования и регистрации. Для проведения исследований в минимальных объемах многие авторы разработали полную аналитическую платформу, включающую в себя систему позиционирования, которая состоит из амплификаторов для используемых реагентов и биологических образцов. В данном случае учет результатов реакции может быть выполнен только при помощи ВЦР, так как визуальная регистрация не применима [15, 22, 24, 25].

Кроме того, применение ВЦС в массовых масштабах поможет стабилизировать критерии оценки положительных и отрицательных результатов анализа при скрининге, разработать подходы для ведения внутрилабораторного контроля качества. ВЦР также позволяет оценить воспроизводимость используемого диагностического теста и определить коэффициент вариации результатов реакции, для расчета которого используются численные значения интенсивности агглютинации, полученные в ходе программной обработки. Этот подход дает возможность рассчитывать минимальную определяемую концентрацию искомого биоагента. Для оценки правильности разработанного авторами метода проведено сравнительное исследование РЛА обычным традиционным методом с визуальной регистрацией и микрометодом в формате матрицы с ВЦР [8, 9, 21].

Данные статистической обработки результатов РЛА методом корреляционного анализа выявили высокую степень совпадения данных, полученных разными иммунологическими методами: макрометодом и микрометодом с видеорегистрацией [10, 16, 21, 24, 25].

Заключение

Таким образом, ВЦС является эффективным автоматизированным средством регистрации результатов иммунохимических тестов в лабораторной диагностике. С его помощью возможно получение и сохранение первичного изображения данных и достижение высокой объективности оценки результатов анализа за счет применения программных средств обработки результатов. Сохранение полученных результатов лабораторных исследований позволяет ретроспективно оценивать и контролировать возможные ошибки, сопоставляя результаты с показателями повторных и дублирующих анализов. Применение новой аналитической технологии ВЦР предоставляет специалистам по лабораторной диагностике в бактериологии и вирусологии новые возможности совершенствования, объективизации и оценки лабораторных исследований.

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Литература

1. Аковбян В.А. Новый диагностический комплекс серологических реакций на сифилис: прощание с Вассерманом // Consilium medicum. — 2003. — Т. 5. — № 3. — С. 150–152.
2. Венгеров Ю.Ю., Барский В.Е., Волощук С.Г. и др. Способ проведения клинического и биохимического анализа биологических жидкостей. Патент № 2325644, Бюл. № 15 от 27.05.2008.
3. Венгеров Ю.Ю., Барский В.Е., Папченко А.А. и др. Способ проведения клинического и биохимического анализа биологических жидкостей и устройство для его осуществления (варианты). Патент на изобретение № 2157994. — Бюл. № 29 от 20.10.2000.
4. Венгеров Ю.Ю. Иммунохроматографические «быстрые» тесты с компьютерной видеоцифровой регистрацией — эффективная лабораторная технология для массовых анализов // Клиническая лабораторная диагностика — 2000. — № 9. — С. 19.
5. Волощук С.Г., Старовойтова Т.А., Кутвицкий В.А. и др. Системы видеоцифрового анализа для лабораторной

- диагностики. Аппаратура и программное обеспечение // Лабораторная медицина. — 2002. — № 5. — С. 82–87.
6. *Дзантиев Б.Б., Жердев А.В., Попов В.О. и др.* Системы экспрессной иммунодетекции биологически активных соединений // Клиническая лабораторная диагностика. — 2002. — № 8. — С. 25–31.
 7. *Зайко В.В., Старовойтова Т.А., Волощук С.Г. и др.* Системы регистрации и анализа изображений для задач клинической лабораторной диагностики // Клиническая лабораторная диагностика. — 2005. — № 10. — С. 25–26.
 8. *Зайко В.В., Мартынкина Л.П., Стериополо Н.А. и др.* Аналитические характеристики микроматричного полуколичественного метода проведения серийных латексных тестов с видеодигитальной регистрацией // Клиническая лабораторная диагностика. — 2008. — № 6. — С. 17–20.
 9. *Зайко В.В., Мартынкина Л.П., Стериополо Н.А. и др.* Мультиплексная аналитическая система для проведения тестов латексной агглютинации в микроформате с видеодигитальной регистрацией // Клиническая лабораторная диагностика. — 2007. — № 9. — С. 39.
 10. *Зайко В.В., Мартынкина Л.П., Стериополо Н.А. и др.* Система на основе сканера для документирования, объективизации и регистрации результатов тестов латексной агглютинации // Клиническая лабораторная диагностика. — 2006. — № 12. — С. 18–21.
 11. *Зайко В.В.* Биохимические и иммунохимические исследования в микроматричном формате на основе видеодигитальной регистрации: дис. ... канд. биол. наук. — СПб., 2008. — 117 с.
 12. *Козлов А.В.* Аналитические возможности методов латекс-агглютинации // Terra Medica. — 2005. — № 1(6). — С. 11–19.
 13. Комплекс аппаратно-программный Эксперт-лаб // Эколаб [Электронный ресурс]. URL: <http://www.ekolab.ru/catalogue/Equipment/complex/> (Дата обращения 24.03.2017).
 14. *Коноплева М.В., Даниленко В.В., Чернова Т.А. и др.* Аппаратно-программный комплекс для серологической диагностики сифилиса методом РПГА «Критерий-2» // Клин. дерматология и венерология. — 2006. — № 4. — С. 17–22.
 15. *Мартынкина Л.П., Старовойтова Т.А., Стериополо Н.А. и др.* Информативность экспресс-латекс-тестов при использовании видеодигитальной регистрации // Клинико-лабораторный консилуим. — 2009. — № 6. — С. 56–62.
 16. *Мирзабеков А.Д., Прокопенко Д.В., Четчин В.Р.* Применение матричных биочипов с иммобилизованной ДНК в биологии и медицине / В кн.: Информационные медико-биологические технологии. — М: ГЭОТАР-Мед. — 2002. — С. 166–198.
 17. *Папченко А.А., Старовойтова Т.А., Волощук С.Г. и др.* Анализаторы и программное обеспечение для видеодигитальной регистрации результатов электрофоретических и иммуноферментных определений // Клиническая лабораторная диагностика. — 1999. — № 9. — С. 50.
 18. *Семенов, И.А., Малыгина Г.Ф.* Автоматизация диагностики РПГА с использованием спектрофотометра // XXXIII неделя науки СПбГПУ. Материалы межвузовской научно-технической конференции. — 2005. — Ч. V. — С. 119–121.
 19. *Старовойтова Т.А., Волощук С.Г., Максимова Е.В. и др.* Высоко-производительные скрининг методы на основе микро-дот анализа с видеодигитальной регистрацией // Клиническая лабораторная диагностика — 1999. — № 10. — С. 16.
 20. *Старовойтова Т.А., Егоров Е.Е., Максимова Е.В. и др.* Иммуно-хроматографические тесты определения онкомаркеров с видеодигитальной регистрацией — перспективы для первичной диагностики злокачественных образований // Клиническая лабораторная диагностика. — 2000. — № 10. — С. 14–15.
 21. *Старовойтова Т.А., Стериополо Н.А., Зайко В.В. и др.* Видеодигитальная регистрация: новые перспективы лабораторной диагностики // Клинический лабораторный консилуим. — 2009. — № 5. — С. 45–55.
 22. *Старовойтова Т.А., Стериополо Н.А., Зайко В.В. и др.* Видеодигитальный анализ для лабораторной диагностики: комплекс «Эксперт-Лаб» на основе сканера для документирования и регистрации результатов латекс-агглютинационных тестов и иммуноферментных исследований / Материалы докладов семинаров и конференции в рамках выставки «AnalyticaExpo-2006». — М., 2006. — С. 42–43.
 23. *Старовойтова Т.А., Стериополо Н.А., Зайко В.В. и др.* Микроминиатюризация лабораторных технологий: перспективы и проблемы // Клинико-лабораторный консилуим. — 2009. — № 5(30). — С. 45–55.
 24. *Старовойтова Т.А., Зайко В.В., Стериополо Н.А. и др.* Видеодигитальный анализ для лабораторной диагностики: комплекс «Эксперт-Лаб» на основе сканера для документирования, объективизации и регистрации результатов латекс-агглютинационных, гемагглютинационных тестов, изосерологических и иммуноферментных исследований // Лаборатория. — 2006. — № 1. — С. 19–22.
 25. *Стериополо Н.А., Зайко В.В., Калачева О.С. и др.* Применение сканера для регистрации результатов иммуноферментного анализа в стандартных микропланшетах // Клиническая лабораторная диагностика. — 2006. — № 11. — С. 44–47.
 26. *Стериополо Н.А., Старовойтова Т.А., Зайко В.В. и др.* Видеодигитальная система «Эксперт-Лаб» для регистрации и объективизации результатов латекс-агглютинационных тестов в формате 96-луночного планшета // Клиническая лабораторная диагностика. — 2007. — № 9. — С. 37.
 27. *Яшечкин Ю.И., Бойко А.В., Кузнецов О.С., Киреев М.Н.* Видеодигитальное документирование результатов лабораторных исследований и алгоритм их количественной оценки / В сборнике: Современные проблемы биофизики,

- генетики, электроники и приборостроения. Материалы III Всероссийского семинара памяти профессора Ю.П. Волкова. — 2017. — С. 98–100.
28. *Davies S., McIntyre S.M., McKinven A.* Evaluation of a new Staphylococcus aureus latex agglutination kit, Prolex Staph Xtra, against other third-generation kits // *Br. J. Biomed. Sci.* — 2008. — Vol. 65. — No. 3. — P. 142–144.
 29. *Erwa H.H., Waxed W.R., Brighton W.D.* A latex agglutination test for the measurement of antibodies to group specific streptococcal polysaccharides // *Clin. Exp. Immunol.* — 1969. — Vol. 4. — P. 311–321.
 30. *Galton M.M., Sulzer C.R., Santa Rosa C.A., Fields M.J.* Application of micro technique to the agglutination test for leptospiral antibodies // *Appl. Microbiol.* — 1965. — Vol. 13. — No. 1. — P. 81–85.
 31. *Gupta S. et al.* Machine Learning to Automate the Visual Interpretation of Chemical Agglutination Tests // 2022 IEEE International Conference on Pervasive Computing and Communications Workshops and other Affiliated Events (PerCom Workshops). — IEEE, 2022. — P. 230–235.
 32. *Kitao K., Norisuye T.* Latex agglutination analysis by novel ultrasound scattering techniques // *Ultrasonics.* — 2022. — Vol. 119. — P. 106581. doi: 10.1016/j.ultras.2021.106581.
 33. *Luo Y. et al.* Quantitative particle agglutination assay using mobile holographic imaging and neural networks // *CLEO: Applications and Technology*. Optica Publishing Group, 2022. — Art. ATh2I.5. doi: 10.1364/CLEO_AT.2022.ATh2I.5.
 34. *Oyamada Y., Ozuru R., Masuzawa T., Miyahara S., Nikaido Y., Obata F., Saito M., Villanueva S.Y.A.M., Fujii J.* A machine learning model of microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis // *PLoS One.* — 2021. — Vol. 16. — No. 11. — e0259907. doi: 10.1371/journal.pone.0259907.
 35. *Park C., Ngo H., Lavitt L. R., Karuri V., Bhatt S., Lubell-Doughtie P., Shankar A.H., Ndwiga L., Osofi V., Wambua J.K. et al.* The design and evaluation of a mobile system for rapid diagnostic test interpretation // *Proceedings of the ACM on Interactive Mobile Wearable and Ubiquitous Technologies.* — 2021. — Vol. 5. — No. 1. — P. 1–26.
 36. *Vengerov Y.Y., Voloshuk S.G., Barsky V.E. et al.* Multifield image analysis approach: imagers, hardware, software // 1st International Meeting on Imaging Technique in Planar Chromatography (ITPC'99). Eds. Vovk I., Prosek M., Medja A. — Jezersko (Slovenia), 1999. — P. 73–76.
 - logicheskikh zhidkostey. Patent № 2325644, Byul. № 15 ot 27.05.2008 (in Russian).
 3. *Vengerov YuYu, Barskiy VYe, Papchenko AA i dr.* Sposob provedeniya klinicheskogo i biokhimicheskogo analiza biologicheskikh zhidkostey i ustroystvo dlya yego osushchestvleniya (varianty). Patent na izobreteniyе № 2157994. Byul. № 29 ot 20.10.2000 (in Russian).
 4. *Vengerov YuYu.* Immunokhromatograficheskiye «bystryye» testy s komp'yuternoy videotsifrovoy registratsiyey — effektivnaya laboratornaya tekhnologiya dlya massovykh analizov. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostik* 2000; 9: 19 (in Russian).
 5. *Voloshchuk SG, Starovoytova TA, Kutvitskiy VA i dr.* Sistemy videotsifrovogo analiza dlya laboratornoy diagnostiki. *Apparatura i programmnoye obespecheniye. Laboratornaya meditsina* 2002; 5:82–87 (in Russian).
 6. *Dzantiyev BB, Zherdev AV, Popov VO i dr.* Sistemy ekspresnoy immunodetskii biologicheski aktivnykh soyedineniy. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2002; 8:25–31 (in Russian).
 7. *Zayko BV, Starovoytova TA, Voloshchuk SG i dr.* Sistemy registratsii i analiza izobrazheniy dlya zadach klinicheskoy laboratornoy diagnostiki. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2005; 10:25–26 (in Russian).
 8. *Zayko VV, Martynkina LP, Steriopol NA i dr.* Analiticheskiye kharakteristiki mikromatrichnogo polukolichestvennogo metoda provedeniya seriynykh lateksnykh testov s videotsifrovoy registratsiyey. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2008; 6:17–20 (in Russian).
 9. *Zayko VV, Martynkina LP, Steriopol NA i dr.* Mul'tipleksnaya analiticheskaya sistema dlya provedeniya testov lateksnoy agglyutinatsii v mikroformate s videotsifrovoy registratsiyey. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2007; 9:39 (in Russian).
 10. *Zayko VV, Martynkina LP, Steriopol NA i dr.* Sistema na osnove skanera dlya dokumentirovaniya, ob'yektivizatsii i registratsii rezul'tatov testov lateksnoy agglyutinatsii. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2006; 12:18–21 (in Russian).
 11. *Zayko VV.* Biokhimicheskiye i immunokhimicheskiye issledovaniya v mikromatrichnom formate na osnove videotsifrovoy registratsii: dis ... kand biol nauk. St. Petersburg, 2008: 117 (in Russian).
 12. *Kozlov AV.* Analiticheskiye vozmozhnosti metodov lateksagglyutinatsii. *Terra Medica* 2005; 1(6):11–19 (in Russian).
 13. *Kompleks apparatno-programmnyy Ekspert-lab. Eko-lab.* URL: <http://www.ekolab.ru/catalogue/Equipment/complex> (Data obrashcheniya 24.03.2017) (in Russian).
 14. *Konopleva MV, Danilenko VV, Chernova TA i dr.* Apparato-programmnyy kompleks dlya serologicheskoy diagnostiki siflisa metodom RPGA «Kriteriy-2». *Klin dermatologiya i venerologiya* 2006; 4:17–22 (in Russian).
 15. *Martynkina LP, Starovoytova TA, Steriopol HA i dr.* Informativnost' ekspres-lateks-testov pri ispol'zovanii vid-

References

1. *Akovbyan VA.* Novyy diagnosticheskiy kompleks serologicheskikh reaktsiy na sifilis: proshchaniye s Vassermanom. *Consilium medicum* 2003; 5(3):150–152 (in Russian).
2. *Vengerov YuYu, Barskiy VYe., Voloshchuk SG i dr.* Sposob provedeniya klinicheskogo i biokhimicheskogo analiza bio-

- eotsifrovoy registratsii. Kliniko-laboratornyy konsilium 2009; 6:56–62 (in Russian).
16. Mirzabekov AD, Prokopenko DV, Chechetkin VR. Primeneniye matrichnykh biochipov s immobilizovannoy DNK v biologii i meditsine. V kn.: Informatsionnyye mediko-biologicheskiye tekhnologii. Moscow: GEOTAR-Med, 2002; 166–198 (in Russian).
 17. Papchenko AA, Starovoytova TA, Voloshchuk SG i dr. Analizatory i programmnoye obespecheniye dlya videotsifrovoy registratsii rezul'tatov elektroforeticheskikh i immunofermentnykh opredeleniy. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika 1999; 9:50 (in Russian).
 18. Semenov, I.A., Malykhina G.F. Avtomatizatsiya diagnostiki RPGA s ispol'zovaniyem; spektrofotometra // XXXIII nedelya nauki SPbGPU. Materialy mezhvuzovskoy nauchno-tekhnicheskoy konferentsii, 2005; Ch. V: 119–121 (in Russian).
 19. Starovoytova TA, Voloshchuk SG, Maksimova YeV i dr. Vysoko-proizvoditel'nyye skining metody na osnove mikro-dot analiza s videotsifrovoy registratsiyey. Klinicheskaya laboratornaya diagnostik 1999; 10:16 (in Russian).
 20. Starovoytova TA, Yegorov YeYe, Maksimova YeV i dr. Immuno-khromatograficheskiye testy opredeleniya onko-markerov s videotsifrovoy registratsiyey – perspektivy dlya pervichnoy diagnostiki zlokachestvennykh obrazovaniy. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika 2000; 10:14–15 (in Russian).
 21. Starovoytova TA, Steriopolu NA, Zayko VV i dr. Videotsifrovaya registratsiya: novyye perspektivy laboratornoy diagnostiki. Klinicheskyy laboratornyy konsilium 2009; 5:45–55 (in Russian).
 22. Starovoytova TA, Steriopolu NA, Zayko VV i dr. Videotsifrovoy analiz dlya laboratornoy diagnostiki: kompleks «Ekspert-Lab» na osnove skanera dlya dokumentirovaniya i registratsii rezul'tatov lateks-agglyutinatsionnykh testov i immunofermentnykh issledovaniy. Materialy dokladov seminarov i konferentsii v ramkakh vystavki «AnalyticaExpo-2006». Moscow, 2006:42–43 (in Russian).
 23. Starovoytova TA, Steriopolu NA, Zayko VV i dr. Mikrominiaturizatsiya laboratornykh tekhnologiy: perspektivy i problemy. Kliniko-laboratornyy konsilium 2009; 5(30):45–55 (in Russian).
 24. Starovoytova TA Zayko VV, Steriopolu NA i dr. Videotsifrovoy analiz dlya laboratornoy diagnostiki: kompleks «Ekspert-Lab» na osnove skanera dlya dokumentirovaniya, ob'yektivizatsii i registratsii rezul'tatov lateksagglyutinatsionnykh, gemagglyutinatsionnykh testov, izoserologicheskikh i immunofermentnykh issledovaniy. Laboratoriya 2006; 1:19–22 (in Russian).
 25. Steriopolu NA, Zayko VV, Kalacheva OS i dr. Primeneniye skanera dlya registratsii rezul'tatov immunofermentnogo analiza v standartnykh mikroplanshetakh. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika 2006; 11:44–47 (in Russian).
 26. Steriopolu NA, Starovoytova TA, Zayko VV i dr. Videotsifrovaya sistema «Ekspert-Lab» dlya registratsii i ob'yektivizatsii rezul'tatov lateks-agglyutinatsionnykh testov v formate 96-lunchnogo plansheta. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika 2007; 9:37 (in Russian).
 27. Yashechkin YuI, Boyko AV, Kuznetsov OS, Kireyev MN. Videotsifrovoye dokumentirovaniye rezul'tatov laboratornykh issledovaniy i algoritm ikh kolichestvennoy otsenki. V sbornike: Sovremennyye problemy biofiziki, genetiki, elektroniki i priborostroyeniya. Materialy III Vserossiyskogo seminaru pamyati professora YuP Volkova. 2017; 98–100 (in Russian).
 28. Davies S, McIntyre SM, McKinven A. Evaluation of a new Staphylococcus aureus latex agglutination kit, Prolex Staph Xtra, against other third-generation kits. Br J Biomed Sci 2008; 65(3):142–144.
 29. Erwa HH, Waxedt WR, Brighton WD. A latex agglutination test for the measurement of antibodies to group specific streptococcal polysaccharides. Clin Exp Immunol 1969; 4:311–321.
 30. Galton MM, Sulzer CR, Santa Rosa CA, Fields MJ. Application of micro technique to the agglutination test for leptospiral antibodies. Appl Microbiol 1965; 13(1):81–85.
 31. Gupta S et al. Machine Learning to Automate the Visual Interpretation of Chemical Agglutination Tests // 2022 IEEE International Conference on Pervasive Computing and Communications Workshops and other Affiliated Events (PerCom Workshops). IEEE, 2022:230–235.
 32. Kitao K, Norisuye T. Latex agglutination analysis by novel ultrasound scattering techniques. Ultrasonics 2022; 119:106581. doi: 10.1016/j.ultras.2021.106581.
 33. Luo Y et al. Quantitative particle agglutination assay using mobile holographic imaging and neural networks. CLEO: Applications and Technology. Optica Publishing Group, 2022:ATh2I.5. doi: 10.1364/CLEO_AT.2022.ATh2I.5.
 34. Oyamada Y, Ozuru R, Masuzawa T, Miyahara S, Nikaido Y, Obata F, Saito M, Villanueva SYAM, Fujii J. A machine learning model of microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. PLoS One 2021; 16(11):e0259907. doi: 10.1371/journal.pone.0259907.
 35. Park C, Ngo H, Lavitt L R, Karuri V, Bhatt S, Lubell-Doughtie P, Shankar AH, Ndwigwa L, Osoti V, Wambua JK et al. The design and evaluation of a mobile system for rapid diagnostic test interpretation. Proceedings of the ACM on Interactive Mobile Wearable and Ubiquitous Technologies 2021; 5(1):1–26.
 36. VengerovYY, Voloshuk SG, Barsky VE et al. Multifield image analysis approach: imagers, hardware, software. 1st International Meeting on Imaging Technique in Planar Chromatography (ITPC'99). Eds Vovk I, Prosek M, Medja A. Jezersko (Slovenia), 1999:73–76.

OPPORTUNITIES AND PROSPECTS FOR OPTIMIZING LABORATORY DIAGNOSTICS BASED ON DIGITAL VIDEO ANALYSIS (REVIEW)

D.M. FROLOV, T.V. ZAMARINA, E.V. PIMENOVA, A.V. ELKHOVA, A.T. YAKOVLEV

Volgograd Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Volgograd

Video digital recording (VCR) is an effective automated means of fixing the results of immunochemical tests in laboratory diagnostics. With its help, it is possible to obtain and save the primary image of the data and achieve high objectivity in the evaluation of the results of the analysis through the use of software tools for processing the results. Saving the acquired data will provide an opportunity to retrospectively evaluate and control for possible errors, comparing the results with the indicators of repeated and duplicate analyzes.

Keywords: laboratory diagnostics, digitalization, digital video recording, reviews.

Address:

Frolov D.M.

Researcher laboratory of immunology, Volgograd Research

Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

E-mail: frodm86@yandex.ru

Для цитирования:

Фролов Д.М., Замарина Т.В., Пименова Е.В., Елхова А.В., Яковлев А.Т. Возможности и перспективы оптимизации лабораторной диагностики на основе видеодигитального анализа (обзор). Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(2):67–75.

For citation:

Frolov D.M., Zamarina T.V., Pimenova E.V., Elkhova A.V., Yakovlev A.T. Opportunities and prospects for optimizing laboratory diagnostics based on digital video analysis (review). Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(2):67–75 (in Russian).

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

А.И. ИСРАПИЛОВА^{1*}, А.А. АДЬЕВА¹, А.М. ДЖАФАРОВА²

¹Прикаспийский институт биологических ресурсов

Дагестанского Федерального исследовательского центра РАН,

²Дагестанский государственный университет, Махачкала, Республика Дагестан

В обзорной статье собраны данные отечественной и зарубежной литературы по проблеме окислительного стресса, свободных радикалов и последствиях их воздействия, а также клинко-фармакологических свойств антиоксидантов. Кроме того, приведена современная классификация антиоксидантов, их механизмы действия, источники, применение в фармацевтической промышленности, их терапевтические свойства и токсикологические аспекты антиоксидантов.

Ключевые слова: свободные радикалы, активные формы кислорода, окислительный стресс, антиоксиданты.

1. Общая характеристика свободных радикалов и их биологическая роль

Различные эндогенные и экзогенные факторы могут привести к генерации целого ряда активных форм кислорода (АФК) в организме человека, для которых может быть характерна как радикальная, так и нерадикальная природа [46]. Среди всех основных процессов в организме, по-видимому, самым значимым источником АФК является дыхательный процесс, при котором около 1–2% кислорода преобразуется в супероксидный радикал ($\cdot\text{O}_2^-$) [17].

Свободный радикал представляет собой либо целую молекулу, а также составной элемент, имеющий электрон без пары, находящийся как на молекулярной, так и на внешней орбитали атома. Наличие такого неспаренного электрона приводит к развитию окислительного стресса. Вследствие того, что имеется данный электрон, система приобретает способность к быстрым реакциям химических элементов. Таким образом, возрастает риск деформации биологически важных молекул [38].

Свободные радикалы работают как акцептор электронов и, забирая электроны у других молекул, переходят в активную форму. К наиболее распространенным клеточным активным формам кислорода относятся супероксидные ($\cdot\text{O}_2^-$), пероксильные ($\text{ROO}\cdot$), гидроксиль-

ные ($\text{OH}\cdot$), алкоксильные ($\text{RO}\cdot$) и липидпероксильные ($\text{LOO}\cdot$) радикалы. АФК нерадикальной природы не имеют неспаренных электронов, но склонны обмениваться электронами с другими молекулами, что в итоге приводит к образованию свободных радикалов в результате различных химических реакций. Также к АФК можно отнести перекись водорода (H_2O_2), синглетный кислород $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$, хлорноватистую кислоту (HOCl), озон (O_3), пероксинитрит (ONOO), триоксид азота (N_2O_3), пероксиды липидов (LOOH) [36].

Кроме того, существуют и активные формы азота, такие как оксид азота ($\text{NO}\cdot$), диоксид азота ($\text{NO}_2\cdot$), а также пероксинитрит ($\text{ONOO}\cdot$), нитропероксикарбонат ($\text{ONOOOCO}_2\cdot$) и ионы нитрония (NO_2^+), а также нейтральные частицы, пероксиазотистая кислота (ONOOH) и триоксид азота (N_2O_3). Данные виды образуются в небольших количествах во время нормальных физиологических клеточных процессов, таких как передача сигналов клетками, мышечная релаксация, нейротрансмиссия, перистальтика, производство клеточной энергии, фагоцитоз и регуляция роста клеток [31].

Благоприятные эффекты АФК проявляются при низких/умеренных концентрациях, но могут быть вредными по мере их увеличения и накопления [35]. К полезным действиям активных форм кислорода и азота в низких концентрациях можно отнести: детоксикацию ксенобиотиков с помощью цитохрома P450; генерацию АТФ в митохондриях (производство энергии) и рост клеток [49]. В низких концентрациях они играют жизненно важную роль в различных клеточных сигналах, таких как активация ядерных факторов транскрипции,

© 2023 г. Исрапилова А.И., Адиева А.А., Джафарова А.М.

* Автор для переписки:

Исрапилова Ашура Исмаиловна

Аспирант ПИБР ДФИЦ РАН

E-mail: ms.israpilova98@bk.ru

высвобождение кальция из внутриклеточных запасов, активация нерецепторных тирозинкиназ, активация сигналов некоторых цитокинов и факторов роста, активация протеинтирозинфосфатаз, транскрипция генов и регуляция активности растворимой гуанилатциклазы в клетках [12]. Образование АФК в определенных границах необходима для поддержания гомеостаза [17].

Важно заметить, что в определенных условиях, при которых происходит активная генерация, АФК становятся инициаторами различных химических реакций, итог которых заключается в распаде частей клеток, а также токсическая окислительная деструкция биомолекул: тканей, нуклеиновых кислот, липидов, белков и углеводов [11].

2. Окислительный стресс

Когда продукция активных форм кислорода и азота превышает способность клеток защищаться от этих реактивных веществ, возникает дисбаланс между системным проявлением свободных радикалов и способностью клеток к их детоксикации [41]. Такой дисбаланс называется окислительным стрессом.

Окислительный стресс в биологических системах представляет собой сложный процесс, который характеризуется дисбалансом между продукцией свободных радикалов (СР) и способностью организма устранять эти реактивные формы за счет использования эндогенных и экзогенных антиоксидантов.

Активные формы кислорода могут образовываться неферментативно в реакциях, катализируемых металлами (как в реакции Фентона), равно как множество АФК образуется в процессе производства АТФ из молекулярного кислорода, процесса, известного как митохондриальное дыхание [13].

При нормальных условиях около 1–5% кислорода, используемого митохондриями, превращается в супероксидные анион-радикалы, которые являются предшественниками других активных форм кислорода, например, радикалы гидроксила и пероксид водорода [10]. Чем выше уровень функционирования электротранспортной цепи, то есть синтеза АТФ, тем больше уровень генерации этих активных частиц [10]. Непрерывная генерация АФК митохондриями на протяжении всей жизни клетки вызывает «хронический» окислительный стресс [20].

Образование АФК происходит на протяжении всего глутамат-кальциевого каскада, однако подавляющее число исследователей полагает, что основополагающее значение в индукции АФК при малом притоке крови к мозгу имеют глутамат- и аспартатергические системы. В частности, при функционировании NMDA-рецепторов на

постсинаптической мембране глутаматергического синапса наблюдается увеличение Ca^{2+} внутри клеток, а также продуктов АФК ($\cdot O_2^-$, OH, NO-радикала) [12].

Кроме того, продукция цитозольных АФК НАДФН-оксидазами может инициировать образование митохондриальных АФК через несколько процессов. Например, открытие редокс-чувствительных АТФ-зависимых калиевых каналов может привести к изменению мембранного потенциала митохондрий и, таким образом, вызвать повышение продукции АФК митохондриями [13].

Немалое количество данных указывает на влияние митохондриальной дисфункции на развитие болезни Альцгеймера (БА). Под митохондриальной дисфункцией понимаются изменения активности комплекса митохондриальных дыхательных ферментов, окислительный стресс и усиление апоптоза [27].

При взаимодействии с белками и липидами АФК способствуют их окислительной модификации. Итогом перекисного окисления липидов служит деформация макромолекул и мембран, вследствие чего повреждается функционал клеточных структур; они не могут должным образом выполнять барьерную функцию. Кроме того, нарушается общность процессов окисления и фосфорилирования на мембранах митохондрий. Следовательно, основные метаболические процессы организма протекают под влиянием окислительного стресса. Помимо этого, АФК способны регулировать процесс репликации вирусов. У больных вирусными заболеваниями обнаружено нарушение работы антиоксидантной защиты [5].

Для нейтрализации АФК и регуляции их уровня с целью поддержания гомеостаза в живых организмах существует сложная ферментативная и неферментативная система антиоксидантной защиты. Однако в случае чрезмерной генерации свободных радикалов происходит истощение компонентов этой системы и возникает дефицит эндогенных антиоксидантов, что способствует прогрессированию многих заболеваний.

3. Антиоксиданты

Биологические системы в насыщенной кислородом среде выработали защитные механизмы — как физиологические, так и биохимические. Среди них на физиологическом уровне: микрососудистая система с функцией поддержания уровня O_2 в тканях, а на биохимическом уровне — антиоксидантная защита. Она может быть ферментативной или неферментативной и к тому же являться системой репарации молекул.

В условиях, при которых значительно меняется скорость генерации свободных радикалов, необходимы

антиоксиданты, обладающие различными свойствами, для поддержания процесса ПОЛ на стационарном уровне [28].

Если говорить кратко, то роль антиоксиданта состоит в том, чтобы перехватить свободный радикал, прежде чем он сможет вступить в реакцию с субстратом. Поэтому антиоксиданты, имеющие биологическое и терапевтическое значение, должны обладать способностью реагировать со свободными радикалами до того, как они начнут взаимодействовать с чувствительным субстратом [17].

4. Классификация и механизм действия антиоксидантов

Антиоксиданты подразделяются на две основные группы, а именно: природные и синтетические [25].

Также группу антиоксидантов можно классифицировать на две подсистемы, среди которых:

- гидрофильные антиоксиданты, полностью растворимые в водной среде;
- липофильные антиоксиданты, растворимые в липидах.

В первом случае антиоксиданты могут вступать в реакцию с окисляющими веществами как в цитозоле клеток, так и в плазме крови. Антиоксиданты, относящиеся к другой группе, липофильные, напротив, выполняют функцию защиты клеточных мембран от перекисного окисления липидов [28].

Природные антиоксиданты — это соединения, содержащиеся в пищевых продуктах, потребляемых без особой обработки: фрукты, овощи, орехи, зерновые, семена, ткани животных и т.д. Они могут и синтезироваться в организме человека [45]. Природные антиоксиданты извлекаются, как правило, в виде смеси нескольких соединений из различных источников. Состав смеси, содержащей действующее(ие) вещество(а) и другие соединения, которые могут быть неактивными или обладающими незначительной активностью, зависит от сорта растения, агротехники, климатических условий, степени спелости и многих других факторов. Активность природных антиоксидантов во многом зависит от их физико-химических свойств и механизма действия.

Природные неферментативные антиоксиданты

В настоящее время классическими антиоксидантами считаются витамины А, Е, С и каротиноиды. Они проявляют активность практически ко всем АФК без присутствия ферментов. АО способны перехватывать АФК и восстанавливать их [3].

Витамины образуют класс микронутриентов, необходимых для правильного функционирования системы антиоксидантных ферментов организма.

Ретинол (витамин А). Витамин А получают вместе с пищей либо в виде каротиноидов провитамина А, либо в виде предварительно сформированного витамина А. Преформированный витамин А поступает в организм в виде длинноцепочечных жирных кислот ретинола.

Аскорбиновая кислота (витамин С). Представляет собой лактон на основе фурана 2-кетоглюконовой кислоты. Антиоксидантная активность аскорбиновой кислоты зависит от ее способности связывать ионы металлов. Способность к торможению аскорбата имеет прямую зависимость от одноэлектронных циклических переходов между дигидро-, монодегидро- и дегидроаскорбатными формами. Что касается аскорбата, то его воздействие, напротив, направлено на окисление, если имеются ионы металлов с переменной валентностью [6]. Это — сильный ингибитор перекисного окисления липидов, который способен восстанавливать витамин Е в липопротеинах и мембранах [42].

Аскорбиновая кислота участвует в инактивации СР, при этом образуя неактивные радикалы, в частности, это семидегидроаскорбат. Помимо этого, аскорбиновая кислота в данном случае представляет собой кофактор пероксидазы [21].

Токоферолы (витамин Е). Свободная гидроксильная группа токоферолов в ароматическом кольце отвечает за антиоксидантные свойства [17]. Антиоксидантная активность токоферола впервые была констатирована в 1930-е годы (Olcott, Emerson, 1937), а повторно интерес к этой проблеме поднял Tappel A. (1962). Токоферол и бета-каротин вступают в клеточные мембраны и предохраняют их от окисления. При взаимодействии с аскорбиновой кислотой указанные вещества образуют долговременный антиоксидантный комплекс. Это участие в процессах стабилизации мембран ведет к изменению их свойств: они становятся более стойкими к свободным радикалам [18, 26].

В клетках витамин Е способен связываться с мембранами, которые обогащены липидами. Главные из них — это митохондрии и эндоплазматическая сеть. Наиболее значимой функцией токоферолов является предотвращение процесса ПОЛ на этапе продолжения цепной реакции. В этом случае α -токоферол отдает собственный атом водорода гидропероксидам и восстанавливает их. Так предотвращается процесс генерации гидропероксидов, и цепная реакция прерывается. Главным образом происходит тушение двух молекул оксиданта одной молекулой α -токоферола [21].

Убихинон Q10 (коэнзим Q), играющий важнейшую роль в переносе электронов в митохондриях, функ-

ционирует как мощный антиоксидант в липопротеинах и иных липидных компонентах различных мембран. Внутри клеток Q10 в основном локализуется в митохондриях.

Убихион состоит из молекул, которые крайне необходимы для того, чтобы электроны с комплексом I и II перешли на комплекс III цепи дыхания. В случае, если наблюдается дефицит убихиона Q10, что может проявляться в сложности движения электронов по дыхательной цепи, то в первую очередь клеточные супероксид-радикалы генерируются комплексами I и III [6].

Кроме того, убихион имеет возможность напрямую вступать в реакцию с окисленной формой α -токоферола (α -ТО \cdot), вследствие чего он будет регенерирован в качестве восстановленной, активной формы (α -ТОФ) [21]. Иными словами, нарушается функционирование молекул витамина E как прооксиданта [6].

Одну из важных ролей в ингибировании свободных радикалов в живых системах играют соединения фенольного типа. Исходя из этого, полифенолы вносят существенный вклад в антиоксидантную систему защиты [36].

Полифенолы поглощают АФК, генерируя более стабильные фенольные радикалы, а затем — молекулярные продукты. Полифенолы представляют собой класс фитохимических веществ, обладающих выраженной антиоксидантной активностью. Их антиоксидантная активность зависит от их химических и физических свойств, которые, в свою очередь, регулируют метаболизм в зависимости от их молекулярной структуры [28].

Флавоноиды — это полифенолы, образованные с помощью флавонового ядра, состоящего из двух ароматических колец. Данные кольца имеют сцепку благодаря С3-мостику. Помимо этого, данные вещества могут быть изучены с точки зрения производных хромана [22]. Показано, что флавоноиды могут вступать в реакцию с гидроксильным радикалом, а также с супероксид-радикалом и перекисными радикалами и образовывать радикалы флавоноидов, которые становятся одним из важных звеньев реакции диспропорционирования [36], тем самым регулируя выработку АФК в нормальных количествах.

В состав первой группы АОС-защиты, помимо всего прочего, входит мелатонин, который обладает особыми нейроантиоксидантными свойствами, благодаря чему он служит самым подходящим ингибитором свободных радикалов. Происходит подавление химической реакции $\text{OH}\cdot$ и гидроперекиси липидов, стабилизируется активность глутатионпероксидазы, которая является явным антиоксидантом [37]. При состоянии ишемии головного мозга мелатонин также вызывает

антиоксидантный эффект, который осуществляется из-за особенного подавления реакции pNOS и ингибирования ONOO [1].

Многие белки связывают ионы меди и железа, и это может сделать белок мишенью для атаки гидроксильным радикалом ($\cdot\text{OH}$). Поэтому для организмов важно, чтобы свободные переходные металлы в биологических жидкостях ограничивались очень низким уровнем. К таким хелатирующим белкам относятся ферритин, лактоферрин и трансферрин [48].

Однако некоторые минералы могут выполнять функции кофакторов ферментов антиоксидантов. Их отсутствие влияет на метаболизм многих макромолекул, таких как углеводы, белки и липиды. Примерами служат медь, железо, марганец, селен и цинк [17].

Ферментные антиоксиданты

Каталаза. Фермент в основном расположен внутри клеток в пероксисомах и катализирующий превращение перекиси водорода в воду и кислород [17]. Учеными выяснено, что менее 1% кислорода, возникающего вследствие разложения перекиси водорода, появляется в метастабильном состоянии. Другими словами, АФК появляются снова именно при разложении перекиси водорода [6].

Помимо этого, находясь в клетках, каталаза, работает совместно с СОД. Изменение активности ферментов сопряжено с изменениями перекиси водорода [7].

Супероксиддисмутаза (СОД) — это фермент, катализирующий реакцию детоксикации супероксидного радикала ($\cdot\text{O}_2^-$) до перекиси водорода (H_2O_2) и кислорода. Затем перекись водорода должна быть удалена каталазой или глутатионпероксидазой. Однако, когда перекись водорода взаимодействует с ионами переходных металлов, таких как железо и медь, образуются наиболее реактивные АФК, гидроксильные радикалы ($\text{OH}\cdot$) (реакция Фентона) [33].

Различают три формы супероксиддисмутазы в тканях млекопитающих [17]. К ним относятся: а) супероксиддисмутаза меди-цинка (CuZnSOD), обнаруженная в цитоплазме и органеллах практически всех клеток млекопитающих; б) супероксиддисмутаза марганца (MnSOD), обнаруженная в митохондриях почти всех клеток; в) внеклеточная супероксиддисмутаза (ECSOD).

Во время функционирования СОД наблюдается распад цепи процессов свободных радикалов, причем цепь прерывается в самом начале, когда восстанавливается одноэлектронный кислород и появляется супероксидный анион-радикал [3].

Также известно, что СОД конкурирует с оксидом азота (NO) за анион супероксида, который инактивирует NO с образованием пероксинитрита. Следовательно, удаляя анион супероксида, он способствует активности NO [16].

Глутатионпероксидаза — катализирует окисление глутатиона за счет гидроперекиси, которая может быть перекисью водорода или другими видами, такими как гидроперекись липидов. Глутатионпероксидазе требуется селен или любой из этих основных минералов, таких как медь, марганец и цинк, в активном центре. В свою очередь, глутатионпероксидаза необходима для выполнения протекторной функции от губительного воздействия окислителями никотинамидных коферментов, липидов, белков. Помимо этого, она способна восстановить липидные перекиси [6].

Глутатионом называется антиоксидант пептидного типа, содержащий цистеин, который синтезируется в клетках организма. Тиоловая группа в цистеиновой части является восстановителем и может быть обратимо окислена и восстановлена. Из-за высокой концентрации и роли глутатиона в поддержании окислительно-восстановительного состояния в клетках он считается одним из наиболее важных клеточных антиоксидантов.

Помимо временной задержки ферментативным путем гидроперекисей липидов, глутатион неферментативным путем инактивирует H_2O_2 и ингибирует АФК с параллельным окислением тиольных групп, непосредственно, до дисульфидов [32, 43]. Чтобы восстановить глутатионтрансферазу в глутатионпероксидазу, в клетках имеется глутатионредуктаза.

Глутатионредуктаза (GR) является вторичным антиоксидантом и катализирует реакцию восстановления глутатиона, а глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (G6PDH) и изоцитратдегидрогеназа обеспечивают глутатионредуктазную реакцию НАДФН. GR необходима для переработки восстановленного глутатиона (GSH) с использованием вторичного фермента GR и НАДФН. Таким образом восстановленный глутатион, наряду с аскорбиновой кислотой и другими соединениями, входит в состав антиоксидантной системы.

Глутатионтрансфераза — неотъемлемая часть процесса детоксикации токсичных метаболитов и ксенобиотиков. Глутатионтрансфераза относится к белкам, которые используют восстановленный глутатион для конъюгации с гидрофобными веществами и восстановления органических пероксидов [2]. Помимо этого, GST могут быть в составе синтеза лейкотриенов, что

влечет за собой продолжение воспалительного процесса в организме [7].

Некоторые недостатки природных АО иногда требуют их замены синтетическими химическими веществами, которые дешевле, более доступны, неизменного качества и обладают большей антиоксидантной активностью [45].

Синтетические антиоксиданты производятся в чистом виде и поэтому могут применяться как в свободном виде, так и в смесях с другими чистыми веществами в определенном составе. Применение их является относительно простым и не требует существенных модификаций рецептуры и условий обработки.

Синтетические антиоксиданты представляют собой фенольные соединения, выполняющие функцию захвата свободных радикалов и остановки цепных реакций. Это соединения, произведенные искусственно и добавленные в обработанные или предварительно упакованные пищевые продукты, чтобы предотвратить прогорклость и потемнение.

Наиболее часто используемые синтетические антиоксиданты включают в себя бутилированный гидроксианизол (BHA), бутилированный гидрокситолуол (BHT), трет-бутилгидрохинон (TBHQ), нордигидрогуаретовую кислоту (NDGA), пропилгаллат (PG), октилгаллат, додецилгаллат и хелатирующие агенты металлов (этилен) диаминтетрауксусная кислота, полифосфатазы). Эти синтетические антиоксиданты проще в использовании, надежнее и, как правило, более рентабельны, чем природные антиоксиданты. Также ожидается, что они нетоксичны, высокоактивны при низких концентрациях (0,01–0,02%), концентрируются на поверхности жировой или масляной фазы, относительно стабильны и способны проникать в клетки [47]. Используются в растительных маслах, хлебобулочных и кондитерских изделиях, косметике и маргарине.

Синтетические фенольные антиоксиданты всегда замещают алкильными группами, чтобы улучшить их растворимость в жирах и маслах и снизить их токсичность. Синтетические соединения, обладающие антиоксидантной активностью, обычно используются в фармацевтике, в качестве консервантов для косметики и для стабилизации жира, масла и липидов в пищевых продуктах [25].

Во многих исследованиях антиоксидантные свойства тестируемого образца сравнивают со свойствами стандартных антиоксидантов. В качестве стандартов можно использовать многие соединения, но критерии их

выбора связаны со стабильностью, ценой и растворимостью стандартного антиоксиданта в растворителе [23].

Наиболее важной характеристикой является состав исследуемого образца, поскольку стандарт антиоксиданта, используемый при определении, должен быть очень близок к исследуемым соединениям.

Trolox представляет собой водорастворимый аналог витамина Е. В качестве антиоксиданта он применяется в биологических и биохимических системах для уменьшения окислительного стресса или повреждения. Его можно использовать для определения антиоксидантной активности как отдельных соединений, так и их смеси [44].

Галловая кислота. Во многих работах, посвященных антиоксидантным свойствам веществ или смесей, галловая кислота применяется в качестве стандартного антиоксиданта [40]. Галловая кислота часто используется в качестве стандартного антиоксиданта, потому что во многих методах она дает наилучший ответ из всех протестированных стандартных соединений.

Мочевая кислота может использоваться в качестве стандартного антиоксиданта благодаря ее естественному присутствию в жидкостях человека (моча, сыворотка, кровь и слюна) [19]. Ее антиоксидантные свойства связаны в основном со способностью удалять пероксинитрит и другие свободные радикалы. Кроме того, она отвечает за защиту ДНК от одноцепочечных разрывов, вызванных активными формами кислорода. Эта роль имеет большое значение при нейродегенеративных заболеваниях [39].

Аскорбиновая кислота (витамин С) считается природным эффективным антиоксидантом и была описана выше [14, 24].

5. Токсикологические аспекты некоторых антиоксидантов

Различные исследования выявили плюсы и минусы антиоксидантов. Антиоксиданты популярны для подавления окислительного стресса и связанных с ним заболеваний, однако неправильное и небрежное применение может привести к токсикологическим эффектам. Концептуально каждый антиоксидант действует как прооксидант после определенной концентрации. Чтобы обеспечить функцию антиоксиданта, необходимо изучить эффект антиоксиданта в отношении дозировки, прооксидантного действия, побочных эффектов, биодоступности и взаимодействия с другими питательными веществами [15].

Джейкман и Максвелл обнаружили, что прием витамина С перед тренировкой приводит к более бы-

строму восстановлению мышечной силы, однако Урсо и Кларксон [34] сообщили, что антиоксидантные добавки могут оказывать негативное влияние на восстановление после упражнений, повреждающих мышцы. Также сообщалось о прооксидантных эффектах витаминов С и Е. В качестве прооксидантов эти витамины создают ионы переходных металлов.

Показано, что прооксидантные эффекты добавок витамина Е вызывают фатальные инфаркты миокарда и ингибируют глутатион-S-трансферазу Р 1-1 (GST Р 1-1). Кроме того, сообщалось, что высокие уровни витамина Е усугубляют нарушение свертываемости крови. γ -Токоферол является эффективным ингибитором фермента циклооксигеназы (ЦОГ-1) [15], который связан со значительным повреждением желудочно-кишечного тракта.

Сходный механизм описан и для β -каротина, который действует как антиоксидант при слабом окислительном стрессе, тогда как в условиях сильного стресса он стимулирует перекисное окисление липидов. Кроме того, нестабильные окисленные метаболиты β -каротина способствуют канцерогенезу. Подобно витаминам С и Е, дигидролипоевая кислота, продукт метаболизма липоевой кислоты, также может действовать как прооксидант. Кофейная кислота, широко используемый антиоксидант, аналогичным образом может действовать как прооксидант при термической обработке [29].

Перечень фактов, связанных со злоупотреблением антиоксидантами, указывает на необходимость проведения подробных токсикологических исследований и специальных стандартов для исключения токсикологических эффектов.

Заключение

1. На основании проведенного анализа литературных источников и результатов проведенных исследований можно сформулировать вывод о том, что нормальная регуляция функционирования организма не может происходить без наличия в ней антиоксидантной системы.

2. Выяснено, что в случаях заболеваний живого организма антиоксидантная система организма работает со сбоями. Но все же антиоксиданты могут нормализовать функционирование системы, оказывая благоприятное воздействие на организм и проводя своеобразную терапию.

3. Антиоксиданты становятся все более интересными для ученых, занятых в производстве пищевых продуктов, и медицинских работников в связи с их защитной

ролью в пищевых продуктах от окислительной порчи и в организме от патологических процессов, опосредованных окислительным стрессом.

4. Многолетние динамические исследования выяснили, что антиоксиданты обладают токсичностью и прооксидантным действием, что требует дополнительных исследований для лучшего понимания и разработки регулирующих норм.

5. Для эффективного исследования источников природных антиоксидантов и создания новых антиоксидантных соединений необходимы надежные методы оценки антиоксидантной активности.

Литература

1. Беленичев И.Ф., Коваленко С.И., Губский Ю.И. и др. Регуляция антиоксидантного гомеостаза и системы детоксикации организма гормоном мелатонином. Роль мелатонин-зависимых рецепторов в реализации этой функции // Совр. пробл. токсикол., 2003. — С. 8–18.
2. Гривенникова В.Д., Виноградов А.Д. Генерация активных форм кислорода митохондриями // Успехи биологической химии. — 2013. — Т. 53. — С. 245–296.
3. Донцов В.И., Крутько В.Н., Мрикаев Б.М., Уханов С.В. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении // Труды Института системного анализа Российской академии наук. — 2006. — Т. 19. — С. 50–69.
4. Залуцкая Н.М., Юшин К.В., Щедрина Л.В. и др. Сравнительная характеристика ферментативной антиоксидантной защиты у больных с мягким когнитивным снижением и депрессией позднего возраста. Возможна ли терапевтическая коррекция? // Обзорение психиатрии и медицинской психологии. — 2018. — № 1. — С. 101–106.
5. Захарычева Т.А., Ковальский Ю.Г., Лебедько О.А., Мжельская Т.В. Оксидативный стресс у больных клещевым энцефалитом на Дальнем Востоке Российской Федерации // Дальневосточный журнал инфекционных патологий, 2012. — С. 41–45.
6. Карбышев М.С., Абдуллаев Ш.П. Биохимия оксидативного стресса. Учебно-методическое пособие. — Москва, 2018. — С. 23–40.
7. Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и биоантиоксиданты: монография. — Минск: Белорусский государственный университет, 2004. — 174 с.
8. Кошевенко Ю.Н. Кожа человека. — М.: «Медицина», 2006. — Т. 1. — С. 32.
9. Рябина Е.И., Зотова Е.Е., Пономарева Н.И. и др. Влияние ферментации и изменения кислотности среды на состав и антиоксидантную активность водных экстрактов чая // Химия растительного сырья. — 2014. — № 2. — С. 169–175.
10. Тодоров И.Н. Митохондрии: окислительный стресс и мутации митохондриальной ДНК в развитии патологии, процессе старения и апоптозе // Российский химический журнал. — 2007. — № 1. — С. 94–98.
11. Узбеков М.Г. Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы при психических заболеваниях. Сообщение III // Социальная и клиническая психиатрия. — 2016. — Т. 26. — № 2. — С. 91–96.
12. Чекман И.С., Беленичев И.Ф., Горчакова Н.А. и др. Антиоксиданты: клиничко-фармакологический аспект. — Киев: Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Запорожский государственный медицинский университет, 2018. — С. 2–10.
13. Abdulle A.E., Diercks G.F.H., Feelisch M. et al. The role of oxidative stress in the development of systemic sclerosis related vasculopathy // Frontiers in Physiology. — 2018. — Vol. 9. — Art. 1177. doi: 10.3389/fphys.2018.01177.
14. Adeniyi J.N., Nlooto M., Ngcobo M. et al. Phytochemical profile and in vitro antioxidant activity of *Emelia M (EMB)*, *Mshikazi* and *Delosma* H herbal medicines as demonstrated in THP-1 and Jurkat leukaemia cell lines // Afr. Health Sci. — 2021. — Vol. 21. — No. 4. — P. 1924–1937.
15. Bast T., Haenen G. The toxicity of antioxidants and their metabolites // Environmental Toxicology and Pharmacology. — 2002. — Vol. 11. — P. 251–258.
16. Chakraborty P., Kumar S., Dutta D., Gupta V. Role of antioxidants in common health diseases // Res. J. Pharm. Technol. — 2009. — Vol. 2. — No. 2. — P. 238–244.
17. Chika J. Mbah, Ifeoma Orabueze, Ndiama H. Okorie. Antioxidants properties of natural and synthetic chemical compounds: Therapeutic effects on biological system // Acta scientific pharmaceutical sciences. — 2019. — Vol. 3. — Issue 6. — P. 31–25.
18. Crouzin N., Jesus Ferreira M.C., CohenSolal C. et al. Alpha-tocopherol-mediated long-lasting protection against oxidative damage involves an attenuation of calcium entry through TRP-like channels in cultured hippocampal neurons // Free Radic. Biol. Med. — 2007. — Vol. 42. — No. 9. — P. 1326–1337.
19. Cybul M., Nowak R. Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych // Herba Pol. — 2008. — Vol. 54. — P. 68–78.
20. Daiber A., Chlopicki S. Revisiting pharmacology of oxidative stress and endothelial dysfunction in cardiovascular disease: Evidence for redox-based therapies // Free Radic. Biol. Med. — 2020. — Vol. 157. — P. 15–37.
21. Daiber A. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species // Biochimica et Biophysica Acta. — 2010. — Vol. 6. — P. 897–898.
22. Dai J., Mumper R.J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties // Molecules. — 2010. — Vol. 15. — Issue 10. — P. 7313–7352.

23. Eruygur N., Koçyiğit U.M., Taslimi P., Ataş M., Tekin M., Gülçin İ. Screening the in vitro antioxidant, antimicrobial, anticholinesterase, antidiabetic activities of endemic *Achillea cucullata* (Asteraceae) ethanol extract // S. Afr. J. Bot. — 2019. — Vol. 120. — P. 141–145.
24. Graczyk F., Gębalski J., Makuch-Kocka A. et al. Phenolic profile, antioxidant, anti-enzymatic and cytotoxic activity of the fruits and roots of *Eleutherococcus senticosus* // Molecules. — 2022. — Vol. 27. — No. 17. — Art. 5579. doi: 10.3390/molecules27175579.
25. Gupta V.K., Kumar A., Pereira M.L. et al. Anti-inflammatory and antioxidative potential of Aloe vera on the Cartap and Malathion mediated toxicity in Wistar rats // Int. J. Environ. Res. Public Health. — 2020. — Vol. 17. — No. 14. — Art. 5177. doi: 10.3390/ijerph17145177.
26. Higuchi H., Ito E., Iwano H., Oikawa S., Nagahata H. Effects of vitamin E supplementation on cellular α -tocopherol concentrations of neutrophils in Holstein calves // Can J. Vet. Res. — 2013. — Vol. 77. — No. 2. — P. 120–125.
27. Liu M., Lv J., Pan Z. et al. Mitochondrial dysfunction in heart failure and its therapeutic implications // Front. Cardiovasc. Med. — 2022. — Vol. 9. — Art. 945142. doi: 10.3389/fcvm.2022.945142.
28. Mandrone M., Lorenzi B., Maggio A. et al. Polyphenols pattern and correlation with antioxidant activities of berries extracts from four different populations of Sicilian *Sambucus nigra* L. // Nat. Prod. Res. — 2014. — Vol. 28. — No. 16. — P. 1246–1253.
29. Maxin G., Cornu A., Andueza D. et al. Carotenoid, Tocopherol, and Phenolic compound content and composition in cover crops used as forage // J. Agric. Food Chem. — 2020. — Vol. 68. — No. 23. — P. 6286–6296.
30. Ma Z., Ren Y., Lu Y., Bruce P.G. Catalytic decomposition of N₂O on ordered crystalline metal oxides // Nanosci. Nanotechnol. — 2013. — Vol. 13. — No. 7. — P. 5093–5103.
31. Mendonça J.D.S., Guimarães R.C.A., Zorgetto-Pinheiro V.A. et al. Natural antioxidant evaluation: A review of detection methods // Molecules. — 2022. — Vol. 27. — No. 11. — Art. 3563. doi: 10.3390/molecules27113563.
32. Nikolaou P.E., Mylonas N., Makridakis M. et al. Cardioprotection by selective SGLT-2 inhibitors in a non-diabetic mouse model of myocardial ischemia/reperfusion injury: a class or a drug effect? // Basic Res. Cardiol. — 2022. — Vol. 117. — No. 1. — Art. 27. doi:10.1007/s00395-022-00934-7.
33. Noori S. An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system // Open Access Scientific Reports. — 2012. — Vol. 1. — Art. 413. doi: 10.4172/scientificreports.413.
34. Oliveira D.C.X., Rosa F.T., Simões-Ambrósio L. et al. Antioxidant vitamin supplementation prevents oxidative stress but does not enhance performance in young football athletes // Nutrition. — 2019. — Vol. 63–64. — P. 29–35.
35. Poprac P., Jomova K., Simunkova M., Kollar V., Rhodes C.J., Valko M. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases // Trends Pharmacol Sci. — 2017. — Vol. 38. — No. 7. — P. 592–607.
36. Rice-Evans C.A. Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status in vivo: procedures and limitations // Free Radic. Res. — 2000. — Vol. 33. — P. 59–66.
37. Rodriguez M.I., Escames G., López L.C. et al. Melatonin administration prevents cardiac and diaphragmatic mitochondrial oxidative damage in senescence-accelerated mice // J. Endocrinol. — 2007. — Vol. 194. — No. 3. — P. 637–643.
38. Serviddio G., Bellanti F., Vendemiale G. Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease // Free Radic. Biol. Med. — 2013. — Vol. 65. — P. 952–968.
39. Settle T., Klandorf H. The role of uric acid as an antioxidant in selected neurodegenerative disease pathogenesis: a short review // Brain Disord. Therapy. — 2014. — Vol. 3. — P. 129–134.
40. Sharma G.N., Gupta G., Sharma P. A Comprehensive review of free radicals, antioxidants, and their relationship with human ailments // Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr. — 2018. — Vol. 28. — No. 2. — P. 139–154.
41. Silva S.V.E., Gallia M.C., Luz J.R.D.D. et al. Antioxidant effect of coenzyme Q10 in the prevention of oxidative stress in arsenic-treated CHO-K1 cells and possible participation of Zinc as a pro-oxidant agent // Nutrients. — 2022. — Vol. 14. — No. 16. — Art. 3265. doi: 10.3390/nu14163265.
42. St-Pierre J., Buckingham J.A., Roebuck S.J., Brand M.D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain // J. Biol. Chem. — 2002. — Vol. 277. — No. 47. — P. 44784–44790.
43. Tamanna N., Kroeker K., Braun K. et al. The effect of short-term methionine restriction on glutathione synthetic capacity and antioxidant responses at the whole tissue and mitochondrial level in the rat liver // Exp. Gerontol. — 2019. — Vol. 127. — Art. 110712. doi: 10.1016/j.exger.2019.110712.
44. Taslimi P., Köksal E., Gören A.C., Bursal E., Aras A., Kılıç Ö., Alwasel S., Gülçini İ. Anti-Alzheimer, antidiabetic and antioxidant potential of *Satureja cuneifolia* and analysis of its phenolic contents by LC-MS/MS // Arab. J. Chem. — 2020. — Vol. 13. — P. 4528–4537.
45. Tleubayeva M.I., Abdullabekova R.M., Datkhayev U.M. et al. Investigation of CO₂ extract of *Portulaca oleracea* for antioxidant activity from raw material cultivated in Kazakhstan // Int. J. Biomater. — 2022. — Art. 6478977. doi:10.1155/2022/6478977.
46. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // International Journal of Biochemistry and Cell Biology. — 2007. — Vol. 39. — Issue 1. — P. 44–84.

47. Xu D.P., Li Y., Meng X. et al. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources // Int. J. Mol. Sci. – 2017. – Vol. 18. – No. 1. – Art. 96. doi: 10.3390/ijms18010096.
48. Zádák Z., Hyspler R., Tichá A. et al. Antioxidants and vitamins in clinical conditions // Physiology Research. – 2009. – Vol. 58. – Suppl. 1. – S13–S17. doi: 10.33549/physiolres.931861.
49. Zhang B., Pan C., Feng C. et al. Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation // Redox Rep. – 2022. – Vol. 27. – No. 1. – P. 45–52.
50. Zhao M., Zhang B., Deng L. The Mechanism of acrylamide-induced neurotoxicity: Current status and future perspectives // Front. Nutr. – 2022. – Vol. 9. – Art. 859189. doi: 10.3389/fnut.2022.859189.
10. Todorov IN. Mitokhondrii: okislitel'nyy stress i mutatsii mitokhondrial'noy DNK v razvitií patologii, protsesse stareniya i apoptoze. Rossiyskiy khimicheskiy zhurnal 2007; 1:94–98 (in Russian).
11. Uzbekov MG. Perekisnoye okisleniye lipidov i antioksidantnyye sistemy pri psikhicheskikh zabolevaniyakh. Soobshcheniye III. Sotsial'naya i klinicheskaya psikhiiatriya 2016; 26(2):91–96 (in Russian).
12. Chekman IS, Belenichev IF, Gorchakova NA i dr. Antioksidanty: kliniko-farmakologicheskii aspekt. Kiyev: Natsional'nyy meditsinskiy universitet imeni AA Bogomol'tsa, Zaporozhskiy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet, 2018: 2–10 (in Russian).
13. Abdulle AE, Diercks GFH, Feelisch M et al. The role of oxidative stress in the development of systemic sclerosis related vasculopathy. Frontiers in Physiology 2018; 9:1177. doi: 10.3389/fphys.2018.01177.
14. Adeniyi JN, Nlooto M, Ngcobo M et al. Phytochemical profile and in vitro antioxidant activity of *Emelia* M (*EMB*), *Mshikazi* and *Delosma* H herbal medicines as demonstrated in THP-1 and Jurkat leukaemia cell lines. Afr Health Sci 2021; 21(4):1924–1937.
15. Bast T, Haenen G. The toxicity of antioxidants and their metabolites. Environmental Toxicology and Pharmacology 2002; 11:251–258.
16. Chakraborty P, Kumar S, Dutta D, Gupta V. Role of antioxidants in common health diseases. Res J Pharm Technol 2009; 2(2):238–244.
17. Chika J Mbah, Ifeoma Orabueze, Ndiamaka H Okorie. Antioxidants properties of natural and synthetic chemical compounds: Therapeutic effects on biological system. Acta scientific pharmaceutical sciences 2019; 3(6):31–25.
18. Crouzin N, Jesus Ferreira MC, CohenSolal C et al. Alphatocopherol-mediated long-lasting protection against oxidative damage involves an attenuation of calcium entry through TRP-like channels in cultured hippocampal neurons. Free Radic Biol Med 2007; 42(9):1326–1337.
19. Cybul M, Nowak R. Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych. Herba Pol 2008; 54:68–78.
20. Daiber A, Chlopicki S. Revisiting pharmacology of oxidative stress and endothelial dysfunction in cardiovascular disease: Evidence for redox-based therapies. Free Radic Biol Med 2020; 157:15–37.
21. Daiber A. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. Biochimica et Biophysica Acta 2010; 6:897–898.
22. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 2010; 15(10):7313–7352.
23. Eryugur N, Koçyiğit UM, Taslimi P, Ataş M, Tekin M, Gülçin İ. Screening the in vitro antioxidant, antimicrobial, anticholinesterase, antidiabetic activities of endemic *Achillea*

References

1. Belenichev IF, Kovalenko SI, Gubskiy Yul i dr. Regulyatsiya antioksidantnogo gomeostaza i sistemy detoksikatsii organizma gormonom melatoninom. Rol' melatonin-zavisimyykh retseptorov v realizatsii etoy funktsii. Sovr probl toksikol, 2003: 8–18 (in Russian).
2. Grivennikova VD, Vinogradov AD. Generatsiya aktivnykh form kisloroda mitokhondriyami. Uspekhi biologicheskoy khimii 2013; 53:245–296 (in Russian).
3. Dontsov VI, Krut'ko VN, Mrikayev BM, Ukhanov SV. Aktivnyye formy kisloroda kak sistema: znacheniyе v fiziologii, patologii i yestestvennom starenii. Trudy Instituta sistemnogo analiza Rossiyskoy akademii nauk 2006; 19: 50–69 (in Russian).
4. Zalutskaya NM, Yushchin KV, Shchedrina LV i dr. Sravnitel'naya kharakteristika fermentativnoy antioksidantnoy zashchity u bol'nykh s myagkim kognitivnym snizheniyem i depressiyey pozdnego vozrasta. Vozmozhna li terapevticheskaya korrektsiya? Obozreniye psikhiiatrii i meditsinskoy psikhologii 2018; 1:101–106 (in Russian).
5. Zakharycheva TA, Koval'skiy YUG, Lebed'ko OA, Mzhel'skaya TV. Oksidativnyy stress u bol'nykh kleshchevym entsefalitom na Dal'nem Vostoke Rossiyskoy Federatsii. Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnykh patologiy, 2012: 41–45 (in Russian).
6. Karbyshev MS, Abdullaev ShP. Biokhimiya oksidativnogo stressa. Uchebno-metodicheskoye posobiye. Moskva, 2018: 23–40 (in Russian).
7. Kostyuk VA, Potapovich AI. Bioradikaly i bioantioksidanty: monografiya. Minsk: Belorusskiy gosudarstvennyy universitet, 2004: 174 (in Russian).
8. Koshevenko YuN. Kozha cheloveka. Moscow: «Meditsina», 2006; 1: 32 (in Russian).
9. Ryabinina YeI, Zotova YeYe, Ponomareva NI i dr. Vliyaniye fermentatsii i izmeneniya kislotnosti sredy na sostav i antioksidantnyuyu aktivnost' vodnykh ekstraktov chaya. Khimiya rastitel'nogo syr'ya 2014; 2:169–175 (in Russian).

- cucullata* (*Asteraceae*) ethanol extract. *S Afr J Bot* 2019; 120:141–145.
24. Graczyk F, Gębalski J, Makuch-Kocka A et al. Phenolic profile, antioxidant, anti-enzymatic and cytotoxic activity of the fruits and roots of *Eleutherococcus senticosus*. *Molecules* 2022; 27(17):5579. doi: 10.3390/molecules27175579.
 25. Gupta VK, Kumar A, Pereira ML et al. Anti-inflammatory and antioxidative potential of Aloe vera on the Cartap and Malathion mediated toxicity in Wistar rats. *Int J Environ Res Public Health* 2020; 17(14):5177. doi: 10.3390/ijerph17145177.
 26. Higuchi H, Ito E, Iwano H, Oikawa S, Nagahata H. Effects of vitamin E supplementation on cellular α -tocopherol concentrations of neutrophils in Holstein calves. *Can J Vet Res* 2013; 77(2):120–125
 27. Liu M, Lv J, Pan Z et al. Mitochondrial dysfunction in heart failure and its therapeutic implications. *Front Cardiovasc Med* 2022; 9:945142. doi: 10.3389/fcvm.2022.945142.
 28. Mandrone M, Lorenzi B, Maggio A et al. Polyphenols pattern and correlation with antioxidant activities of berries extracts from four different populations of Sicilian *Sambucus nigra* L. *Nat Prod Res* 2014; 28(16):1246–1253.
 29. Maxin G, Cornu A, Andueza D et al. Carotenoid, Tocopherol, and Phenolic compound content and composition in cover crops used as forage. *J Agric Food Chem* 2020; 68(23):6286–6296.
 30. Ma Z, Ren Y, Lu Y, Bruce PG. Catalytic decomposition of N_2O on ordered crystalline metal oxides. *Nanosci Nanotechnol* 2013; 13(7):5093–5103.
 31. Mendonça JDS, Guimarães RCA, Zorgetto-Pinheiro VA et al. Natural antioxidant evaluation: A review of detection methods. *Molecules* 2022; 27(11):3563. doi: 10.3390/molecules27113563.
 32. Nikolaou PE, Mylonas N, Makridakis M et al. Cardio-protection by selective SGLT-2 inhibitors in a non-diabetic mouse model of myocardial ischemia/reperfusion injury: a class or a drug effect? *Basic Res Cardiol* 2022; 117(1):27. doi:10.1007/s00395-022-00934-7.
 33. Noori S. An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. *Open Access Scientific Reports* 2012; 1:413. doi: 10.4172/scientificreports.413.
 34. Oliveira DCX, Rosa FT, Simões-Ambrósio L et al. Antioxidant vitamin supplementation prevents oxidative stress but does not enhance performance in young football athletes. *Nutrition* 2019; 63–64:29–35.
 35. Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2017; 38(7):592–607.
 36. Rice-Evans CA. Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status in vivo: procedures and limitations. *Free Radic Res* 2000; 33:59–66.
 37. Rodriguez MI, Escames G, López LC et al. Melatonin administration prevents cardiac and diaphragmatic mitochondrial oxidative damage in senescence-accelerated mice. *J Endocrinol* 2007; 194(3):637–643.
 38. Serviddio G, Bellanti F, Vendemiale G. Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med* 2013; 65:952–968.
 39. Settle T, Klandorf H. The role of uric acid as an antioxidant in selected neurodegenerative disease pathogenesis: a short review. *Brain Disord Therapy* 2014; 3:129–134.
 40. Sharma GN, Gupta G, Sharma P. A Comprehensive review of free radicals, antioxidants, and their relationship with human ailments. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2018; 28(2):139–154.
 41. Silva SVE, Gallia MC, Luz JRDD et al. Antioxidant effect of coenzyme Q10 in the prevention of oxidative stress in arsenic-treated CHO-K1 cells and possible participation of Zinc as a pro-oxidant agent. *Nutrients* 2022; 14(16):3265. doi: 10.3390/nu14163265.
 42. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002; 277(47):44784–44790.
 43. Tamanna N, Kroeker K, Braun K et al. The effect of short-term methionine restriction on glutathione synthetic capacity and antioxidant responses at the whole tissue and mitochondrial level in the rat liver. *Exp Gerontol* 2019; 127:110712. doi: 10.1016/j.exger.2019.110712.
 44. Taslimi P, Köksal E, Gören AC, Bursal E, Aras A, Kılıç Ö, Alwasel S, Gülçini İ. Anti-Alzheimer, antidiabetic and antioxidant potential of *Satureja cuneifolia* and analysis of its phenolic contents by LC-MS/MS. *Arab J Chem* 2020; 13:4528–4537.
 45. Tleubayeva MI, Abdullabekova RM, Datkhayev UM et al. Investigation of CO_2 extract of *Portulaca oleracea* for antioxidant activity from raw material cultivated in Kazakhstan. *Int J Biomater* 2022:6478977. doi:10.1155/2022/6478977.
 46. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2007; 39(1):44–84.
 47. Xu DP, Li Y, Meng X et al. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *Int J Mol Sci* 2017; 18(1):96. doi: 10.3390/ijms18010096.
 48. Zadak Z, Hyspler R, Tichá A et al. Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiology Research* 2009; 58(1):S13–S17. doi: 10.33549/physiolres.931861.
 49. Zhang B, Pan C, Feng C et al. Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation. *Redox Rep* 2022; 27(1):45–52.
 50. Zhao M, Zhang B, Deng L. The Mechanism of acrylamide-induced neurotoxicity: Current status and future perspectives. *Front Nutr* 2022; 9:859189. doi: 10.3389/fnut.2022.859189.

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF NATURAL AND SYNTHETIC COMPOUNDS

A.I. ISRAPILOVA¹, A.A. ADIEVA¹, A.M. JAFAROVA²

¹ *Caspian Institute of Biological Resources of the Dagestan Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences,*

² *Dagestan State University, Makhachkala, Republic of Dagestan*

The review article contains data from domestic and foreign literature on oxidative stress, free radicals and the consequences of their impact, as well as the clinical and pharmacological properties of antioxidants. In addition, the modern classification of antioxidants, their mechanisms of action, sources, use in the pharmaceutical industry, their therapeutic properties and toxicological aspects of antioxidants are given.

Keywords: free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress, antioxidants.

Address:

Israpilova A.I.

Postgraduate student Caspian Institute of Biological Resources

Dagestan Federal Research Center RAS

E-mail: ms.israpilova98@bk.ru

Для цитирования:

Исрапилова А.И., Адиева А.А., Джафарова А.М. Антиоксидантные свойства природных и синтетических химических соединений. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(2):76–86.

For citation:

Israpilova, A.I. Adieva A.A., Jafarova A.M. Antioxidant properties of natural and synthetic compounds. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(2):76–86 (in Russian).

МАГНИТНЫЕ СОРБЕНТЫ: ХАРАКТЕРИСТИКА, ОСНОВНЫЕ СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ, СВОЙСТВА И ИХ ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ В БИМЕДИЦИНЕ

Т.В. ЖАРНИКОВА*, Т.В. ТАРАН, Т.В. БЕРДНИКОВА, И.Ю. БОРЗДОВА, Н.М. ШВЕЦОВА, И.Н. ЗАЙКИНА, Ю.М. ЕВЧЕНКО, В.И. ЕФРЕМЕНКО, М.Е. МИХАЙЛОВА

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь

Обзор посвящен общей характеристике, основным способам получения, свойствам и области применения магнитных сорбентов в биомедицине, обсуждению приоритетных требований, предъявляемых к магнитным сорбентам, их преимуществам и недостаткам. Магнитные сорбенты с определенным составом и свойствами, разрабатываемые для каждого конкретного случая, позволяют сконцентрировать и быстро, эффективно выделить белки, нуклеиновые кислоты из большого объема загрязненных проб, избегая стадии центрифугирования. Они также могут применяться при лечении сложных заболеваний в качестве магнитной адресной доставки в медицине, магнитных контрастирующих агентов при получении изображений методом магнитного резонанса.

Ключевые слова: магнитные сорбенты (МС), магнитные композиционные сорбенты, нуклеиновые кислоты, модификаторы, иммобилизация, ПЦР, ДНК, РНК.

Введение

Магнитные сорбенты (МС) и их перспективные приложения в последние годы привлекают все большее внимание исследователей из различных областей химии, биологии, медицины, ветеринарии. Интерес к этим материалам вызван рядом необычных физических и химических свойств. Достоинство магнитных частиц заключается в возможности управлять их перемещением с помощью внешнего постоянного магнитного поля. На основе магнитных частиц оксидов железа разработаны уникальные средства для медицины и биохимии: контрастные вещества для магнитно-резонансной томографии; магнитоуправляемые лекарственные препараты химиотерапевтического, диагностического и гипертермического действия для целевой доставки лекарственных веществ; магнитные сорбенты для выделения популяций клеток, субклеточных культур, белков и ДНК, РНК [9].

Использование магнитного нанокompозита, особенно с диоксидом кремния, позволяет решать ряд важных задач, в том числе биомедицинского характера, так как данный материал сочетает в себе свойства функционального покрытия и магнитного ядра. Одной из таких задач является получение высокоочищенных препаратов нуклеиновых кислот (НК) для целей медицинской диагностики, в частности, для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР), являющейся одним из самых точных методов диагностики наследственных и инфекционных заболеваний [6].

Общая характеристика магнитных сорбентов

Магнитные сорбенты представляют собой особый тип материалов, имеющих высокую площадь поверхности на единицу объема, развитую пористость, хорошо определенные свойства поверхности, регулируемые диаметры пор, высокую механическую и химическую прочность и термостойкость. Они обладают магнитными свойствами, которые позволяют управлять ими при наложении постоянного магнитного поля, что делает эти материалы подходящими для использования в таких процессах, как катализ, разделение биологических клеток и т.д. [38].

Суть получения магнитных материалов заключается во включении дискретной магнитной фазы в слабые или немагнитные носители для повышения их магнитной восприимчивости, предотвращения агломерации

© 2023 г. Жарникова Т.В., Таран Т.В., Бердникова Т.В., Борздова И.Ю., Швецова Н.М., Зайкина И.Н., Евченко Ю.М., Ефременко В.И., Михайлова М.Е.

* **Автор для переписки:**

Жарникова Татьяна Владимировна
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории подготовки специалистов, ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора
E-mail: tvzhara@yandex.ru

магнитных частиц (МЧ) и извлечении магнитного наноконструкта из водной среды после его использования. Инкапсуляция магнитных частиц в структуры сорбентов снижает их агрегацию, что делает магнитные наноконструкты подходящими носителями для различных молекул, в том числе и лекарственных [35].

Выбор оптимального сорбента с требуемыми текстурными, структурными и физико-химическими характеристиками может обеспечить сорбционные свойства, необходимые для конкретных лекарственных препаратов и белков, а придание сорбентам магнитных свойств позволит осуществить адресную доставку лекарственных веществ, повысить эффективность адсорбции исследуемых патогенов, провести качественную пробоподготовку при постановке ПЦР [6].

Главное достоинство МС заключается в возможности дистанционного управления ими и композициями на их основе при наложении внешнего постоянного магнитного поля.

Основные способы получения и свойства магнитных сорбентов

В последнее время интенсивно ведутся работы по синтезу магнитных сорбентов для решения задач биотехнологии, медицины.

Существует большое разнообразие МС, состоящих из Fe, Co, Ni, их оксидов [9]. Наибольшее внимание получили именно наночастицы магнетита (Fe_3O_4) из-за своих уникальных свойств, таких как суперпарамагнетизм, низкая токсичность и биосовместимость.

Наночастицы магнетита с размером частиц <10 нм демонстрируют квантовые размерные эффекты и большие площади поверхности, что приводит к очень интересному явлению, известному как суперпарамагнетизм (то есть проявляют магнетизм только в присутствии внешнего магнитного поля) и, таким образом, перемещаются в определенное место в присутствии внешнего постоянного магнитного поля или нагреваются в присутствии внешнего переменного магнитного поля.

Несмотря на то, что МЧ Fe_3O_4 обладают большой площадью поверхности и высокой сорбционной способностью, а их поверхность покрыта гидроксогруппами из-за окисления и агрегации, они не могут быть использованы в качестве магнитных сорбентов доставки лекарственных веществ (ЛВ) [9]. Кроме того, МЧ Fe_3O_4 сами по себе не обладают селективностью, что служит одним из основных критериев эффективности сорбента для данных целей. Также, если речь идет о

системе доставки ЛВ, МЧ Fe_3O_4 быстро покрываются белками плазмы путем опсонизации сразу после введения в кровоток, что делает эти частицы узнаваемыми ретикулоэндотелиальной системой (РЭС), и выводятся из плазмы крови. Поэтому основным критерием применения МЧ Fe_3O_4 является их коллоидная стабильность, которая достигается поверхностной модификацией. Именно поэтому перспективным направлением суперпарамагнитных наночастиц стало использование их в качестве магнитного ядра для создания магнитовосприимчивых сорбентов со структурой типа «ядро-оболочка». Для использования в качестве оболочки подходят низкомолекулярные, полимерные и неорганические соединения, которые улучшают физико-химические свойства полученных композиционных материалов.

Разработка наноконструкта, сочетающего в себе свойства магнитных наночастиц и пористых сорбентов, позволяет объединить в себе преимущества обоих материалов: магнитные свойства, большую площадь поверхности, а также исключить недостатки, такие как агрегация и окисление магнитных наночастиц и, таким образом, получить высокоэффективные сорбенты с превосходными адсорбционными характеристиками и возможностью управления с помощью постоянного магнитного поля.

Существуют различные методы получения МЧ Fe_3O_4 , такие как химическое соосаждение [24], гидротермальный синтез [45], золь-гель метод, термическое разложение [40], микроволновой метод [47] и др.

Одним из самых распространенных, простых и эффективных методов получения МЧ Fe_3O_4 является метод соосаждения стехиометрической смеси солей железа (II) и (III) (метод Массара) в водной среде [9]. Суть метода заключается в осаждении оксида железа путём смешения ионов трехвалентного и двухвалентного железа при молярном соотношении 1:2 в высокоосновных растворах с рН от 8 до 14 при комнатной или повышенной температурах.

Существуют различные варианты этого метода, которые отличаются типом использованных солей железа (например, хлоридов, сульфатов, нитратов, перхлоратов и т.д.) и осадителя, соотношением солей, температурой и продолжительностью синтеза. Варьирование того или иного параметра дает возможность контролировать размер и морфологию наночастиц.

Другим наиболее распространенным, но более сложным методом получения МЧ Fe_3O_4 , представляется гидротермальный синтез. Суть метода состоит в восстановлении солей железа многоатомными спиртами в при-

сутствии различных солей при повышенных температурах и давлениях. Метод синтеза заключается в растворении соли железа (III) и ацетата натрия в этиленгликоле в водном растворе. Полученную суспензию помещают в автоклав и подвергают гидротермальной обработке при температуре 200 °С от 4 до 18 ч. После охлаждения автоклава продукт отделяют от маточного раствора. Несмотря на длительность и сложность синтеза, данный метод позволяет получать однородные по размерам частицы [9]. Изменяя условия синтеза (давление, температура, время реакции и используемые прекурсоры), можно контролировать процесс роста нанокристаллитов.

Один из недостатков получения МЧ Fe_3O_4 методом химического соосаждения заключается в агломерации частиц, вызванной процессом созревания Оствальда [10]. Стабильность МЧ обеспечивается равновесием сил отталкивания и притяжения. На малых расстояниях основной вклад вносят силы Ван-дер-Ваальса и электростатические взаимодействия. Для стабилизации (модификации) наночастиц магнетита можно менять некоторые параметры системы, влияющие на электростатическое или стерическое взаимодействие. Чаще всего оказывается влияние на электростатическое отталкивание, которое зависит от диффузного потенциала, имеющего прямую взаимосвязь с дзета-потенциалом [5].

Выбор стабилизатора представляет собой сложную задачу, которую можно решить только экспериментальным путём. Поэтому существует большой объём научных работ, посвящённых данной теме. Правильно подобранный стабилизатор способен не только предотвратить агломерацию магнитных наночастиц, но и дать возможность дальнейшей функционализации поверхности, которая позволит получить более сложные специфические структуры [10].

Магнитные сорбенты можно разделить на две группы. К первой группе относятся наноконкомпозиты со структурой типа «ядро-оболочка», где в качестве ядра используют НЧ Fe_3O_4 , а в качестве оболочки применяют низкомолекулярные, полимерные и неорганические соединения, необходимые для стабилизации и защиты магнитного ядра. Ко второй группе относятся композитные материалы, содержащие инкапсулированные на поверхности НЧ Fe_3O_4 [9]. Синтез первой группы сорбентов может быть осуществлён с помощью двух подходов. Первый включает в себя получение НЧ Fe_3O_4 методом щелочного гидролиза солей железа (II) и (III) из растворов в присутствии сорбента с последующим осаждением. Второй подход заключается в добавлении предварительно полученных НЧ Fe_3O_4 к матрице в во-

дном растворе. В обоих подходах НЧ Fe_3O_4 закрепляются на поверхности сорбента посредством слабых сил межмолекулярного взаимодействия. Таким образом, НЧ Fe_3O_4 не защищены оболочкой носителя, что приводит к распределению наночастиц по размерам, низкой воспроизводимости результатов, окислению, коррозии и, как следствие, потере намагниченности НЧ Fe_3O_4 , а также отделению плохо закрепленных НЧ от поверхности матрицы в ходе эксплуатации магнитного сорбента [3]. Получение магнитных сорбентов со структурой «ядро-оболочка» исключает все вышеупомянутые недостатки. Данный подход позволяет получить функциональный композит, объединяющий в себе преимущества обоих материалов, магнитные свойства НЧ Fe_3O_4 и высокую сорбционную емкость, селективность, стабильность оболочки и исключающий недостатки, такие как низкую прочность закрепления магнетита на поверхности носителя, агломерацию, окисление, коррозию и потерю намагниченности НЧ Fe_3O_4 .

Для стабилизации наночастиц магнетита применяют: низкомолекулярные стабилизаторы, полимерные покрытия, неорганические покрытия [3]. Среди низкомолекулярных стабилизаторов наночастиц магнетита наиболее часто используются соединения с карбоксильными, фосфатными и сульфатными функциональными группами [5]. Хорошо известна способность поверхности наночастиц магнетита сорбировать молекулы лимонной кислоты, что приводит к возникновению отрицательного заряда поверхности и увеличивает ее гидрофильность.

Водорастворимые полимерные покрытия также могут быть применены в качестве стабилизирующих агентов. Природные полисахариды, например, декстран, арабиногалактан, глюкозаминогликан и хитозан, или синтетические полимеры, такие как сульфопроизводные полистиролов, полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт, полуксамеры и полиоксамины описываются в литературе в качестве покрытий [5]. Наночастицы магнетита, стабилизированные полимерами, используются в МРТ как контрастные агенты для обнаружения патологических изменений в печени, селезенке, лимфатических узлах или мозге. В клиническую практику уже вошли такие препараты, как «Синерем», «Комбидекс», «Ферекс», состоящие из наночастиц магнетита и маггемита, покрытых декстраном. Однако тонкое полимерное покрытие не подходит для защиты очень активных НЧ- Fe_3O_4 . Кроме того, НЧ- Fe_3O_4 , стабилизированные одинарным или двойным слоями поверхностно-активных веществ или полимеров, являются не стабильными на воздухе и легко выщелачиваются кислотными растворами, что

приводит к потере их намагниченности. Поэтому наиболее эффективной стратегией стабилизации НЧ- Fe_3O_4 служит создание оболочки из неорганических пористых материалов [3].

Биохимическая активность инкапсулированного ЛВ в неорганической матрице существенно увеличивается по сравнению с полимерными материалами, используемыми в настоящее время. Физико-химические свойства носителей ЛВ оказывают существенное влияние на стабильность лекарственных молекул, поэтому важно изучить материалы, которые имеют четко определенную пористую структуру, большую доступную площадь поверхности на единицу объема, высокую механическую и химическую прочность, а также термостойкость. Кроме того, идеальное покрытие должно иметь регулируемую гидрофильную/гидрофобную поверхность и очень высокую стабильность для применений в биологических системах. Многие твердые сорбенты были тщательно исследованы при приготовлении магнитных наноконструктов для решения различных проблем. Например, композиты на основе кварца [12], стеклянных волокон [25], анионообменных носителей [44], которые используются в хроматографических сепарационных колонках; цеолитов [19], оксида графена [41], углеродных нанотрубок [15], талька [29], монтмориллонита [14], графена [21] и кремнезема [6], бентонита [37], активированного угля [48].

Мезопористый кремний имеет сотовую структуру пор с регулируемым диаметром пор от 2 до 50 нм, обладает высокой удельной площадью поверхности и объемом пор, высокой сорбционной емкостью, биосовместимостью, а также термической и химической стабильностью. Кремнезем, нанесенный на НЧ Fe_3O_4 , представляет собой одно из наиболее часто используемых неорганических покрытий, так как он улучшает стабильность магнитных наночастиц, защищает их от окисления, а также снижает любые потенциальные токсические эффекты НЧ Fe_3O_4 . Данное покрытие уменьшает агрегацию наночастиц, повышает их стабильность в жидкой среде, позволяет осуществлять поверхностную модификацию различными функциональными группами, снижает цитотоксичность МЧ. Наиболее распространенный способ получения сорбентов со структурой SiO_2 - Fe_3O_4 является золь-гель метод (метод Штобера), сопряженный с использованием токсичного тетраэтоксисилана (ТЭОС) и значительного количества абсолютного этанола [1]. Возможно использование процесса гидролиза силиката натрия как доступного и экологичного прекурсора оксида кремния [39].

Применение простого метода осаждения гидроксидов железа и кремния с использованием доступных неорганических реагентов перспективно для разработки набора с целью выделения нуклеиновых кислот. Синтез МЧ λ - $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ из раствора Na_2SiO_3 и солей железа состоит из нескольких стадий: окисления, прогрева и отмывки [6].

При введении соляной кислоты в раствор Na_2SiO_3 нуклеация и рост фазы оксида кремния наиболее вероятны на активной поверхности свежесозданных наночастиц магнетита. Согласно данным электронной микроскопии и седиментационного анализа, окисление частиц Fe_3O_4 до λ - $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ в матрице оксида кремния повышает прочность связи между компонентами в наноконструкте, предотвращая нежелательное отделение фазы оксида кремния во время операций по сорбции и выделению НК. Кроме того, фаза λ - Fe_2O_3 отличается более высокой химической и термической устойчивостью по сравнению с фазой Fe_3O_4 . Таким образом, для сохранения долговременной стабильности свойств синтезированного магнитного сорбента вводились стадии контролируемого окисления и прогрева водной суспензии $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ с целью формирования материала состава λ - $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$. Установлено, что количество SiO_2 в составе композита является ключевым фактором, влияющим на размер частиц и, соответственно, устойчивость их водной суспензии. При высоком содержании SiO_2 (>50 масс. %) формируются крупные частицы с диаметром более 500 нм, которые быстро (<3 мин) оседают под действием силы тяжести. При содержании SiO_2 менее 10 масс. % образуются частицы с $d < 20$ нм, которые не полностью отделяются от жидкой среды в магнитном поле. Наличие следов высокодисперсного SiO_2 в маточном растворе приводит к ингибированию ПЦР при последующем анализе НК, что снижает эффективность метода. На основании данных седиментационного анализа был выбран оптимальный состав, соответствующий 30–40 масс. % SiO_2 . Удельная поверхность синтезированного порошка λ - $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ составляет 170–180 м²/г. Тем не менее полученные значения удельной поверхности не в полной мере могут характеризовать процесс сорбции молекул НК из-за недостатка сведений о механизме их взаимодействия с частицами SiO_2 . Имеются лишь единичные работы, в которых делаются предположения о возможном характере сорбции молекул ДНК поверхностью SiO_2 [6].

Важными факторами, влияющими на эффективность магнитной сепарации микроколичеств ДНК, являются структурная целостность сорбента и отсутствие в растворе немагнитной фракции мелких частиц, при-

водящей к потере биоматериала. Структурную целостность исследованных образцов достигают окислением фазы Fe_3O_4 до $\lambda\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ в составе нанокompозита и дополнительным прогревом водной суспензии частиц $\lambda\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ на заключительной стадии синтеза. Селективность выделения ДНК/РНК определяется главным образом вспомогательными компонентами набора для выделения НК [6].

Большое количество реакционно-способных силанольных групп, присутствующих на поверхности кремнезема, можно использовать для дальнейшей функционализации поверхности [20, 28].

Флуоресцентные магнитные нанокompозиты путем слияния оболочки мезопористого кремнезема с НЧ Fe_3O_4 и меченым флуоресцеин-5-изотиоцианатом при внутривенном введении мышам накапливаются в печени и селезенке. Эти материалы могут быть использованы для одновременного мониторинга МРТ печени или селезенки, а также адресной доставки лекарств с использованием внешнего магнитного поля. Хотя наночастицы мезопористого кремния часто рассматриваются в качестве потенциальных носителей для доставки лекарств, данные об их безопасности и токсичности в различных литературных источниках неоднозначны и противоречивы.

В работе [26] сообщали, что при подкожной инъекции у частиц SiO_2 отсутствовала какая-либо токсичность и они обладали хорошей биосовместимостью. Напротив, внутрибрюшинные и внутривенные инъекции мышам в высоких дозах (30 мг на мыш) вызывали сильную системную токсичность и приводили животных к гибели. В другой работе [33] при сравнении противоопухолевой активности кремнезема, загруженного противоопухолевым лекарственным препаратом доксорубицином, и свободных НЧ SiO_2 было обнаружено, что матрица увеличивала терапевтический эффект лекарственного препарата. Кроме того, одним из основных недостатков, ограничивающим применение мезопористого кремния, является необходимость модификации поверхности различными функциональными группами для связывания с лекарственными молекулами, так как на его поверхности находятся только силанольные группы.

Магнитовосприимчивые сорбенты могут быть получены на основе синтетических пористых алюмосиликатов — цеолитов. Алюмосиликатные наночастицы обладают высокоразвитой активной поверхностью с системой разветвленных каналов и сообщающихся полостей, способных инкапсулировать ионы, атомы и молекулы, размер которых сопоставим с размером входных окон цеолита. Максимальные размеры входных окон в цеолитах могут

достигать 1–1,5 нм, поэтому цеолиты идеально подходят для использования в качестве носителя для небольших молекул ЛВ. Пористая структура позволяет контролировать загрузку лекарственных молекул и постепенно высвобождать его с контролируемой скоростью, а развитая поверхность с большим разнообразием активных центров дает возможность делать это без дополнительной модификации поверхности [4]. Кроме того, цеолиты обладают биосовместимостью и биодоступностью.

Одним из перспективных подходов получения магнитных композитов на основе цеолитов со структурой «ядро-оболочка» является гидротермальный синтез, в ходе которого кристаллический рост алюмосиликатов происходит вокруг МЧ Fe_3O_4 . Условия направленного гидротермального синтеза позволяют регулировать химический состав, дисперсность и пористо-текстурные характеристики алюмосиликатов, что обеспечивает получение материалов с магнитными свойствами. В ряде работ были получены структуры типа «ядро-оболочка» на основе цеолитов и наночастиц магнетита [17, 31] с размером частиц 600 нм и более, что подходит для использования этих материалов в качестве сорбентов для биотехнологических задач, но ограничивает возможности их использования для задач медицины. В частности, для разработки на их основе систем доставки лекарственных препаратов с парентеральным введением. В работе [34] синтезирован магнитный цеолитный композит с высокой адсорбционной способностью для ионов свинца из водных растворов. Бразовской Е.Ю. [3] показана эффективность синтезированного композиционного материала со структурой «ядро-оболочка» на основе цеолита Beta в гидротермальных условиях (200 кПа, 140 °С, 48 ч) из геля, допированного наночастицами магнетита, поверхность которых была модифицирована катионным полимером — полидиаллилдиметиламмоний хлорид.

Для повышения эффективности магнитного выделения нуклеиновых кислот, повышения селективности сорбции нуклеиновых кислот и/или их фрагментов длиной более 500 п.н. предложен магнитный сорбент, являющийся водной дисперсией, содержащей композиционный материал, который представляет собой наночастицы магнетита, допированного катионами меди, цинка и кобальта. Наночастицы распределены в матрице диоксида кремния. Упомянутая дисперсия содержит также хаотропный агент и реагент для увеличения ионной силы раствора.

В твердофазных методах выделения нуклеиновых кислот с применением сорбентов используются следующие процессы и принципы: а) водородные связи с

немодифицированной гидрофильной матрицей, обычно кварцем, в хаотропных условиях; б) ионообмен в водном растворе, обычно с использованием анионообменников; в) аффинность; г) механизмы исключения по размеру [2].

Процесс связывания НК с сорбентом может быть описан как обёртывание нуклеиновых кислот вокруг частицы с помощью ионных и ванн-дер-ваальсовых взаимодействий. Такое взаимодействие в основном обеспечивается на неровной поверхности, например, пористой. Монодисперсные сферические частицы (в основном частицы одинаковых размеров) имеют преимущество относительно полидисперсных, так как обеспечивают воспроизводимость магнитного разделения. В зависимости от дальнейшей обработки образцов не всегда можно оставлять НК на сорбенте. Прямое ПЦР определение ДНК/РНК не может проводиться без элюирования нуклеиновых кислот с поверхности сорбента, так как реакция будет ингибироваться магнитными частицами, их стабилизаторами или оксидами металлов [42]. Элюирование НК с поверхности магнитных частиц может быть достигнуто путём увеличения ионной силы, температуры или рН. Магнитные частицы также эффективно удаляют многие ингибиторы ПЦР [8].

Применение магнитных наночастиц требует их стабильности в растворах, содержащих высокие концентрации белков и солей. Таким образом, ключевой проблемой, стоящей перед использованием МЧ, является стабилизация и функционализация их поверхности. Магнитные наночастицы имеют тенденцию флокулировать из-за сил Ван-дер-Ваальса, а также магнитно притягиваться друг к другу и агломерировать, что снижает их эффективность. Магнитные наночастицы, покрытые подходящей оболочкой, не агломерируют и, следовательно, обладают более высокой химической и коллоидной стабильностью, а также имеют более узкое распределение по размерам в сравнении с наночастицами без оболочки, что имеет решающее значение для биомедицинских применений [43].

Применение магнитных сорбентов

Функционализированные МЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ находят широкое применение в области биомедицины, экологии [20, 28].

Магнитные сорбенты нашли целый ряд эффективных применений в терапии, диагностике ряда тяжелых заболеваний [7], выделения белков, нуклеиновых кислот [6, 8, 25], а также в селективном концентрировании антител, антигенов с последующей их индикацией.

Наряду с мезопористым кремнезёмом цеолиты также рассматривают как потенциальные материалы для использования в медицинских целях, например, для визуализации [32], раневых покрытий [46] и доставки лекарств [49].

Магнитные бionаночастицы активно используются для диагностики, терапии и отображения в реальном времени процессов при онкологических заболеваниях и других болезнях, доставляют связанный с наночастицами терапевтический или диагностический биоматериал к различным областям тела. Целевая направленность доставки может быть обеспечена как физическими силами (магнетик), так и с помощью конъюгирования к поверхности наночастиц антител (специфическими к данной опухоли) [7]. МЧ широко применяются в медицине, так как являются биосовместимым материалом и не обнаруживают серьезных токсических эффектов *in vitro* или *in vivo*. В работе [23] было установлено, что наночастицы магнетита метаболизируются в печени и попадают в эндогенные запасы железа посредством гематопоэза. Установлено, что магнетит выводится из кровяного русла в течение 1–6 ч после внутривенного введения в организм [4].

В настоящее время на территории России для диагностики наследственных и инфекционных заболеваний широко используется метод ПЦР. Одним из ключевых моментов эффективной молекулярно-генетической диагностики является этап пробоподготовки. Соблюдение выработанных годами клинико-диагностической практики требований к каждой процедуре этого этапа крайне необходимо для получения достоверных результатов. Чувствительность метода ПЦР в значительной степени зависит от эффективности выделения ДНК из клинического материала. На данный момент наиболее востребованным в клинической практике методом экстракции ДНК является сорбционный метод. Набор для выделения нуклеиновых кислот (НК) методом магнитоуправляемой сорбции на силике (диоксиде кремния) — наиболее интересная и перспективная разработка. Принципиальным отличием от классического протокола здесь является то, что в качестве сорбента используются магнитные частички, покрытые диоксидом кремния. Это дает очень важное преимущество: промывать осадок можно без использования центрифуги, с использованием только магнитного штатива. Данный метод позволяет работать без дорогостоящего оборудования, а для проведения процедуры экстракции НК таким способом требуется значительно меньше времени, чем при использовании других методик.

В целях пробоподготовки для ПЦР чаще всего применяют поверхностно модифицированные магнитные наночастицы с алкоксисиланами [13] или полиэтиленiminaми [8].

При выделении нуклеиновых кислот происходит неспецифическое выделение ДНК и РНК, содержащихся в образце. Анализ искомой последовательности происходит при помощи таких методов, как ПЦР, гибридизация, секвенирование и тому подобное. В отличие от выделения нуклеиновых кислот, при выделении белков сразу ставится задача получения конкретного белка. Решить такую задачу можно преимущественно методами классической иммунохимии. Чтобы селективно выделить конкретный белок из пула других белков, требуется агент, способный избирательно связываться с данным белком. Такими агентами могут выступать: аффинные антитела; другие молекулы или белки, избирательно связывающиеся с конкретным белком (например, стрептавидин и биотин).

Несмотря на известность множества методов выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов, основными недостатками большинства из них являются непригодность для автоматизации пробоподготовки и высокий риск контаминации белками, липидами, углеводами и другими примесями, которые могут препятствовать реализации необходимых реакций или методов исследования [16].

Эффективность набора реагентов для выделения НК, разработанного на основе синтезированной суспензии λ - $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$, устанавливали по результатам количественного RT-ПЦР анализа с флуоресцентными зондами [6, 36]. В опытах оценивали величину порогового цикла амплификации ПЦР (Cq), характеризующую концентрацию НК в пробе. Близкие значения Cq контрольных образцов ДНК и образцов, подвергнутых магнитной сепарации, свидетельствуют о малых потерях ДНК в процессе выделения и отсутствии ингибирующих ПЦР примесей. Значимых отклонений между предложенной методикой и референсной (коммерческий набор «МАГНО-сорб» производства ЦНИИЭ, Россия) не наблюдается, однако это не позволяет утверждать о близких сорбционных свойствах сравниваемых магнитных сорбентов, так как наборы вспомогательных реагентов различались. Важным является то, что характеристики разработанного набора реагентов соответствуют нормам, принятым для препаратов подобного рода. Положительные результаты опытов со стандартными растворами ДНК и клиническим биоматериалом свидетельствуют о применимости набора для магнитной сепарации НК [6].

На основе МЧ Fe_3O_4 разработаны уникальные материалы, которые могут быть использованы в катализе, для хранения данных, охраны окружающей среды от патогенов как контрастные агенты в МРТ [30]; для адресной доставки лекарственных препаратов химиотерапевтического действия [18]. Кроме того, МЧ Fe_3O_4 часто используются для лечения методом гипертермии [11], биосепарации [22], доставки генов [27], выделения ДНК из клинического материала.

В биомедицине применение МЧ имеет явное преимущество в том, что они могут накапливаться в желаемых областях посредством магнитно-направленной доставки, хотя этот метод все еще нуждается в дальнейшем развитии для достижения оптимальной доставки в опухоли.

Существует достаточно большое число работ, освещающих медицинское применение модификаторов цеолитов в качестве раневых покрытий и энтеросорбентов. На основе имеющихся в литературе научных данных можно предположить, что цеолиты имеют потенциал для разработки систем адресной доставки с контролируемым выходом лекарственных веществ посредством магнитного нацеливания [3].

Высокоэффективные магнитные наноконпозиты могут быть использованы в качестве сорбентов для адсорбции загрязняющих веществ из окружающей среды и носителей лекарственных веществ (ЛВ) — для магнитного нацеливания [7, 10], а также для диагностики и пробоподготовки патогенов с последующей постановкой анализов: серологических (иммуноферментный анализ — ИФА), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), реакции агглютинации латекса (РАЛ); протеомных (масс-спектрометрия).

В результате изучения литературных источников установлено, что в каждом конкретном случае, в зависимости от того, где планируется применять МС, необходим индивидуальный подход для их изготовления. Это значит, что те магнитные сорбенты, которые идеально подходят для выделения нуклеиновых кислот, не подойдут для диагностики ряда тяжелых заболеваний. Магнитные сорбенты для терапии могут не подойти для селективного концентрирования патогенов, выделения нуклеиновых кислот. Так, например, существуют требования к МС, которые должны обеспечивать методы выделения ДНК или РНК: лизис биологического материала; селективную экстракцию (сорбцию); концентрирование из больших объемов; отделение компонентов, которые ингибируют ПЦР; разделение ДНК и РНК; высокий процент выхода; возможность калибровки и положительного контроля;

отсутствие контаминации; малые временные затраты; возможность автоматизации. Некоторые автоматизированные приборы с использованием магнитных частиц уже применяются для подготовки образцов в лабораториях. В Институте аналитического приборостроения РАН разработан макет автоматического прибора для выделения ДНК. Метод, положенный в основу данного устройства, получил условное название метода магнитной ротации. Сепарация частиц из раствора осуществляется на намагниченных стержнях, опущенных в раствор. Отделение магнитных частиц с сорбированными на их поверхности нуклеиновыми кислотами происходит после помещения стержней в реакционную смесь и их намагничивания. Перенос магнитных частиц в пробирку со следующим по протоколу реагентом или раствором осуществляется намагниченными стержнями. После помещения стержней в соответствующую жидкость и размагничивания их вращают для равномерного перемешивания суспензии магнитных частиц и прочих компонентов. Подобный принцип построения устройства позволяет достичь высокого качества очистки и не допустить загрязнения предыдущим промывочным раствором следующего раствора. Результаты испытаний макета автоматического прибора для выделения ДНК количественно оценены при помощи известного серийного анализатора нуклеиновых кислот АНК-32 [1]. В настоящее время разработан ряд импортных приборов для выделения нуклеиновых кислот в автоматическом режиме, например, BioRobot EZ1 (QIAGEN) и MagNA Pure LC instrument (Roche) [2].

Таким образом, выбор оптимального магнитного сорбента с требуемыми физико-химическими характеристиками, методов активации, модификации и иммобилизации может обеспечить сорбционные свойства, необходимые для конкретных целей: для лекарственных препаратов — позволит осуществить адресную доставку ЛВ; для диагностики инфекционных болезней — позволит сконцентрировать лиганд (антиген или антитело) с последующей индикацией. При этом упрощаются и ускоряются все манипуляции, так как нет необходимости в центрифугировании, фильтрации и увеличивается вероятность выявления исследуемых компонентов (при диагностике) за счет селективного концентрирования.

Заключение

Современные исследования в области наноматериалов свидетельствуют о больших перспективах в использовании магнитных сорбентов в биотехнологии, медицине. Важным свойством магнитных наноконпози-

тов является возможность управлять ими под действием внешнего магнитного поля. Основными проблемами при получении магнитовосприимчивых композитов на основе магнетита являются предотвращение их агломерации и окисления, поэтому усилия ученых направлены на создание устойчивого магнитного композиционного сорбента.

Анализ научной литературы показал перспективность предлагаемого исследования по разработке магнитных композиционных сорбентов. Но, несмотря на наличие данных, посвященных синтезу и исследованию таких материалов, результаты разрозненные, сама проблема требует более тщательного и систематического подхода, сравнения различных методов получения таких материалов, исследования их свойств и выбора оптимальных подходов к их синтезу с целью достижения наилучшего сочетания практически важных характеристик.

Использование модификаторов при конструировании магнитных композиционных материалов с заданными физико-химическими характеристиками даст возможность установить основные закономерности взаимодействия магнитных наночастиц и модификаторов, выявить оптимальные соотношения компонентов композиционных матриц и условия получения материалов с наиболее перспективным комплексом свойств (наличие магнитных свойств, микробиологическая, термическая и химическая устойчивость, высокая адсорбционная способность, отсутствие токсичности и способности к биодеградации), а также разработать экономически и экологически выгодные технологии их получения на основе отечественных реагентов.

Таким образом, создание магнитных композиционных сорбентов, функционирующих на нано- и микроуровнях, для биотехнологических, медицинских отраслей требует научно обоснованного подхода к биотехнологии их получения, позволяющего обеспечить определенное распределение частиц по размерам и составу с заданным комплексом свойств, достаточной удельной поверхностью. Это же относится и к целенаправленным способам иммобилизации биолигандов на поверхности сорбентов, что является необходимым условием для: качественной разработки доставки лекарственных препаратов; обеспечения высокочувствительных диагностикомов для экспресс детекции маркеров; эффективной пробоподготовки при постановке ПЦР и т.д.

Литература

1. Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Варламов Д.А. и др. Приборы для диагностики биологических объектов на основе

- метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) // Научное приборостроение. — 2006. — Т. 16. — № 3. — С. 132–136.
2. Антонова О.С., Корнева Н.А., Белов Ю.В., Курочкин В.Е. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии (обзор) // Научное приборостроение. — 2010. — Т. 20. — № 1. — С. 3–9.
 3. Бразовская Е.Ю. Разработка магнитовосприимчивых сорбентов на основе цеолита beta для решения задач медицины и экологии: дис. ... канд. хим. наук. — Санкт-Петербург, 2020. — 137 с.
 4. Голубева О.Ю., Бразовская Е.Ю., Аликина Ю.А., Дьяченко С.В., Жерновой А.И. Синтез и исследование нанокompозитов на основе цеолита Beta и магнетита для адресной доставки лекарственных препаратов // Физика и химия стекла. — 2019. — Т. 45. — № 1. — С. 74–84.
 5. Дроздов А.С. Синтез и физико-химические свойства новых типов функциональных наноматериалов на основе магнетита: дис. ... канд. хим. наук. — Санкт-Петербург, 2017. — 152 с.
 6. Натаров В.О., Котиков Д.А., Сурвило В.Л., Паньков В.В., Перчик А.В., Попова А.В. Магнитные сорбенты на основе нанокompозитных частиц λ -Fe₂O₃/SiO₂ для выделения и очистки ДНК // Свиридовские чтения. Том Выпуск 11. — Минск: Белорусский государственный университет, 2015. — С. 95–104.
 7. Никифоров В.Н. Медицинские применения магнитных наночастиц // Известия академии инженерных наук им. А.М. Прохорова. — 2013. — № 1. — С. 23–34.
 8. Суворова А.О. Микрочиповая аналитическая система для обнаружения рибонуклеиновых кислот с помощью лиофилизированных реактивов методом ПЦР с обратной транскрипцией: дис. ... канд. хим. наук. — Санкт-Петербург, 2015. — 167 с.
 9. Толмачева В.В., Апяри В.В., Кочук Е.В., Дмитриенко С.Г. Магнитные сорбенты на основе наночастиц оксидов железа для выделения и концентрирования органических соединений // Журнал аналитической химии. — 2016. — Т. 71. — № 4. — С. 339–356.
 10. Тюрникова И.А. Получение порошкообразных наноматериалов в системе «Fe₃O₄-углерод»: дис. ... канд. хим. наук. — Санкт-Петербург, 2020. — 155 с.
 11. Bae K.H., Park M., Do M.J., Lee N., Ryu J.H., Kim G.W., Kim C., Park T.G., Hyeon T. Chitosan oligosaccharide-stabilized ferrimagnetic iron oxide nanocubes for magnetically modulated cancer hyperthermia // ACS Nano. — 2012. — Vol. 6. — P. 5266–5273.
 12. Bredmore M.C., Wolfe K.A., Arcibal I.G., et al. Microchip-based purification of DNA from biological samples // Anal. Chem. — 2003. — Vol. 75. — P. 1880–1886.
 13. Bruce I.J., Sen T. Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxy-silanes and their application in magnetic bioseparations // Langmuir. — 2005. — Vol. 21. — P. 7029–7035.
 14. Chang J., Ma J., Ma Q., Zhang D., Qiao N., Hu M., Ma H. Adsorption of methylene blue onto Fe₃O₄/activated montmorillonite nanocomposite // Appl. Clay Sci. — 2016. — Vol. 119. — P. 132–140.
 15. Chen R., Chai L., Li Q., Shi Y., Wang Y., Mohammad A. Preparation and characterization of magnetic Fe₃O₄/CNT nanoparticles by RPO method to enhance the efficient removal of Cr(VI) // Environ. Sci. Pollut. Res. — 2013. — Vol. 20. — No. 10. — P. 7175–7185.
 16. Cseke L.J., Kaufman P.B., Podila G.K., Tsai C.-J. Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine. 2nd edition. — CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2004.
 17. Deng B.Y., Deng C., Qi D., Liu C., Liu J., Zhang X., Zhao D. Synthesis of core/shell colloidal magnetic zeolite microsphere for the immobilization of trypsin // Adv. Mater. — 2009. — Vol. 21. — No. 13. — P. 1377–1382.
 18. Ding Y., Shen S.Z., Sun H., Sun K., Liu F., Qi Y., Yan J. Design and construction of polymerized-chitosan coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and its application for hydrophobic drug delivery // Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. — 2015. — Vol. 48. — P. 487–498.
 19. Faghihian H., Moayed M., Firooz A., Iravani M. Evaluation of a new magnetic zeolite composite for removal of Cs⁺ and Sr²⁺ from aqueous solutions: Kinetic, equilibrium and thermodynamic studies // Comptes Rendus Chimie. — 2014. — Vol. 17. — No. 2. — P. 108–117.
 20. Fan R., Min H., Hong X., Yi Q., Liu W., Zhang Q., Luo Z. Plant tannin immobilized Fe₃O₄-SiO₂ microspheres: A novel and green magnetic bio-sorbent with superior adsorption capacities for gold and palladium // J. Hazard. Mater. — 2019. — Vol. 364. — P. 780–790.
 21. Farghali M.A., El-din T.A.S., Al-enizi A.M., Bahnasawy R.M. Graphene/Magnetite nanocomposite for potential environmental application // Int. J. Electrochem. Sci. — 2015. — Vol. 10. — P. 529–537.
 22. Gruttner C., Muller K., Teller J., Westphal F. Synthesis and functionalization of magnetic nanoparticles for hyperthermia applications // Int. J. Hyperther. — 2013. — Vol. 29. — P. 777–789.
 23. Gupta A.K., Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications // Biomaterials. — 2005. — Vol. 26. — No. 18. — P. 3995–4021.
 24. Hariani P.L., Faizal M., Ridwan M., Setiabudidaya D. Synthesis and properties of Fe₃O₄ nanoparticles by co-precipitation method to removal procion dye // Int. J. Environ. Sci. Dev. — 2013. — Vol. 4. — No. 3. — P. 336–340.
 25. Hoorfar J., Cook N., Malorny B., et al. Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR // J. Clin. Microbiol. — 2003. — Vol. 41. — Art. 5835. doi: 10.1128/JCM.41.12.5835.2003.
 26. Hudson S.P., Padera R.F., Langer R., Kohane D.S. The biocompatibility of mesoporous silicates // Biomaterials. — 2008. — Vol. 29. — P. 4045–4055.

27. Jiang S., Eltoukhy A.A., Love K.T., Langer R., Anderson D.G. Lipidoid-coated iron oxide nanoparticles for efficient DNA and siRNA delivery // *Nano Lett.* — 2012. — Vol. 13. — P. 1059–1064.
28. Jouyandeh M., S. Paran M.R.M., Shabani M., Ghiyasi S., Vahabi H., Badawi M., Formela K., Puglia D., Saeb M.R. Curing behavior of epoxy/Fe₃O₄ nanocomposites: A comparison between the effects of bare Fe₃O₄, Fe₃O₄/SiO₂/chitosan and Fe₃O₄/SiO₂/chitosan/imide/phenylalanine-modified nanofillers // *Progress in Organic Coatings.* — 2018. — Vol. 123. — P. 10–19.
29. Kalantari K., Ahmad M.B., Fard Masoumi H.R., Shameli K., Basri M., Khandanlou R. Rapid adsorption of heavy metals by Fe₃O₄/talc nanocomposite and optimization study using response surface methodology // *Int. J. Mol. Sci.* — 2014. — Vol. 15. — P. 12913–12927.
30. Lee N., Hyeon T. Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents // *Chem. Soc. Rev.* — 2012. — Vol. 41. — P. 2575–2589.
31. Lima T.M., Lima C.G.S., Rathi A.K., Gawande M.B., Tucek J., Urquieta-Gonzalez E.A., Zbořil R., Paixão M.W., Varma R.S. Magnetic ZSM-5 zeolite: a selective catalyst for the valorization of furfuryl alcohol to γ -valerolactone, alkyl levulinates or levulinic acid // *Green Chem.* — 2016. — Vol. 18. — No. 20. — P. 5586–5593.
32. Li Y., Li H., Xiao L., Zhou L., Shentu J., Zhang X. Hemostatic efficiency and wound healing properties of natural zeolite granules in a lethal rabbit model of complex groin injury // *Materials.* — 2012. — Vol. 5. — P. 2586–2596.
33. Maximchik P., Tamarov K., Sheval E.V., Tolstik E., Kirchberger-Tolstik T., Yang Z., Sivakov V., Zhitovitsky B., Osminkina L.A. Biodegradable porous silicon nanocontainers as an effective drug carrier for regulation of the tumor cell death pathways // *ACS Biomater. Sci. Eng.* — 2019. — Vol. 5. — No. 11. — P. 6063–6071.
34. Nah I.W., Hwang K.-Y., Jeon C., Choi H.B. Removal of Pb ion from water by magnetically modified zeolite // *Miner. Eng.* — 2006. — Vol. 19. — No. 14. — P. 1452–1454.
35. Nah I.W., Hwang K.Y., Shul Y.G. A simple synthesis of magnetically modified zeolite // *Powder Technol.* — 2007. — Vol. 177. — No. 2. — P. 99–101.
36. Nolan T., Hands R.E., Bustin S.A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR // *Nat. Protoc.* — 2006. — Vol. 1. — No. 3. — P. 1559–1582.
37. Nourmohamadi G.H., Fazlavi A., Amiri B., Khadijeh C. Investigation on adsorption of Cu⁺² onto synthesized magnetite bentonite nano-adsorbent by CCD design of experiments // *Bull. Georg. Natl. Acad. Sci.* — 2014. — Vol. 8. — P. 497–503.
38. Parsonage P. Coating and carrier methods for enhancing magnetic and flotation separations // *Colloid Chem. Miner.* — 1992. — Vol. 12. — P. 331–360.
39. Rahman I.A., Padavettan V. Synthesis of silica nanoparticles by sol-gel: size-dependent properties, surface modification, and applications in silica-polymer nanocomposites // *J. Nanomater.* — 2012. — Vol. 18. — P. 86–90.
40. Shaker S., Zafarian S., Chakra C.S., Rao K.V. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles by sol gel method for water treatment // *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.* — 2013. — Vol. 2. — P. 969–973.
41. Sharif F., Gagnon L.R., Mulmi S., Roberts E.P.L. Electrochemical regeneration of a reduced graphene oxide/magnetite composite adsorbent loaded with methylene blue // *Water Res.* — 2017. — Vol. 114. — P. 237–245.
42. Spanova A., Horak D., Soudkova E., Rittich B. Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres designed for polymerase chain reactions applications // *J. Chromatogr.* — 2004. — Vol. 800. — No. 1–2. — P. 27–32.
43. Tadic M., Kralj S., Jagodic M., Hanzel D., Makovec D. Magnetic properties of novel superparamagnetic iron oxide nanoclusters and their peculiarity under annealing treatment // *Applied Surface Science.* — 2014. — Vol. 322. — P. 255–264.
44. Teeters M.A., Conrardy S.E., Thomas B.L., et al. Adsorptive membrane chromatography for purification of plasmid DNA // *J. Chromatogr. A.* — 2003. — Vol. 989. — P. 165–173.
45. Wan J., Chen X., Wang Z., Yang X., Qian Y. A soft-template-assisted hydrothermal approach to single-crystal Fe₃O₄ nanorods // *Journal of Crystal Growth.* — 2005. — Vol. 276. — No. 3. — P. 571–576.
46. Widder K.J., Senyei A.E., Scarpelli D.G. Magnetic microspheres: A model system for site specific drug delivery in vivo // *Experimental Biology and Medicine.* — 1978. — Vol. 158. — No. 2. — P. 141–146.
47. Williams M.J., Sanchez E.S., Aluri E.R., Douglas F.J., MacLaren D.A., Collins O.M., Cussen E.J., Budge J.D., Sanders L.C., Michaelis M., Smales C.M., Jr L.S., Lorrio S., Krueger D., Rosales R.T.M., Corr S.A., Williams M.J. Microwave-assisted synthesis of highly crystalline, multifunctional iron oxide nanocomposites for imaging applications // *RSC Adv.* — 2016. — Vol. 6. — No. 87. — P. 83520–83528.
48. Yang N., Zhu S., Zhang D., Xu S. Synthesis and properties of magnetic Fe₃O₄-activated carbon nanocomposite particles for dye removal // *Mater. Lett.* — 2008. — Vol. 62. — P. 645–647.
49. Zhang H., Kim Y., Dutta P.K. Controlled release of paraquat from surface-modified zeolite // *Microporous Mesoporous Mater.* — 2006. — Vol. 88. — No. 1. — P. 312–318.

References

1. Alekseyev YaI, Belov YuV, Varlamov DA i dr. Pribory dlya diagnostiki biologicheskikh ob»yektov na osnove metoda polimeraznoy tsepnoy reaktsii v real'nom vremeni (PTSR-RV). Nauchnoye priborostroyeniye 2006; 16(3): 132–136 (in Russian).

2. Antonova OS, Korneva NA, Belov YUV, Kurochkin VYe. Effektivnyye metody vydeleniya nukleinovykh kislot dlya provedeniya analizov v molekulyarnoy biologii (obzor). Nauchnoye priborostroyeniye 2010; 20(1): 3–9 (in Russian).
3. Brazovskaya YeYu. Razrabotka magnitvospriimchivyykh sorbentov na osnove tseolita beta dlya resheniya zadach meditsiny i ekologii: dis ... kand khim nauk. Sankt-Peterburg, 2020: 137 (in Russian).
4. Golubeva OYu, Brazovskaya YeYu, Alikina YuA, D'yachenko SV, Zhernovoy AI. Sintez i issledovaniye nanokompozitov na osnove tseolita Beta i magnetita dlya adresnoy dostavki lekarstvennykh preparatov. Fizika i khimiya stekla 2019; 45(1):74–84 (in Russian).
5. Drozdov AS. Sintez i fiziko-khimicheskiye svoystva novykh tipov funktsional'nykh nanomaterialov na osnove magnetita: dis ... kand khim nauk. Sankt-Peterburg, 2017: 152 (in Russian).
6. Natarov VO, Kotikov DA, Survilo VL, Pan'kov VV, Perchik AV, Popova AV. Magnitnyye sorbenty na osnove nanokompozitnykh chastits λ - $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ dlya vydeleniya i ochistki DNK. Sviridovskiye chteniya. 11. Minsk: Belorusskiy gosudarstvennyy universitet, 2015: 95–104 (in Russian).
7. Nikiforov VN. Meditsinskiye primeneniya magnitnykh nanochastits. Izvestiya akademii inzhenernykh nauk im AM Prokhorova 2013; 1:23–34 (in Russian).
8. Suvorova AO. Mikrochipovaya analiticheskaya sistema dlya obnaruzheniya ribonukleinovykh kislot s pomoshch'yu liofilizirovannykh reaktivov metodom PTSR s obratnoy transkriptsiyey: dis ... kand khim nauk. Sankt-Peterburg, 2015: 167 (in Russian).
9. Tolmacheva VV, Apyari VV, Kochuk YeV, Dmitriyenko SG. Magnitnyye sorbenty na osnove nanochastits oksidov zheleza dlya vydeleniya i kontsentrirovaniya organicheskikh soyedineniy. Zhurnal analiticheskoy khimii 2016; 71(4):339–356 (in Russian).
10. Tyurikova IA. Polucheniye poroshkoobraznykh nanomaterialov v sisteme « Fe_3O_4 -uglerod»: dis ... kand khim nauk. Sankt-Peterburg, 2020: 155 (in Russian).
11. Bae KH, Park M, Do MJ, Lee N, Ryu JH, Kim GW, Kim C, Park TG, Hyeon T. Chitosan oligosaccharide-stabilized ferrimagnetic iron oxide nanocubes for magnetically modulated cancer hyperthermia. ACS Nano 2012; 6:5266–5273.
12. Breadmore MC, Wolfe KA, Arcibal IG, et al. Microchip-based purification of DNA from biological samples. Anal Chem 2003; 75:1880–1886.
13. Bruce IJ, Sen T. Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxy-silanes and their application in magnetic bioseparations. Langmuir 2005; 21:7029–7035.
14. Chang J, Ma J, Ma Q, Zhang D, Qiao N, Hu M, Ma H. Adsorption of methylene blue onto Fe_3O_4 /activated montmorillonite nanocomposite. Appl Clay Sci 2016; 119:132–140.
15. Chen R, Chai L, Li Q, Shi Y, Wang Y, Mohammad A. Preparation and characterization of magnetic Fe_3O_4 /CNT nanoparticles by RPO method to enhance the efficient removal of Cr(VI). Environ Sci Pollut Res 2013; 20(10):7175–7185.
16. Cseke LJ, Kaufman PB, Podila GK, Tsai C-J. Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine. 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2004.
17. Deng BY, Deng C, Qi D, Liu C, Liu J, Zhang X, Zhao D. Synthesis of core/shell colloidal magnetic zeolite microsphere for the immobilization of trypsin. Adv Mater 2009; 21(13):1377–1382.
18. Ding Y, Shen SZ, Sun H, Sun K, Liu F, Qi Y, Yan J. Design and construction of polymerized-chitosan coated Fe_3O_4 magnetic nanoparticles and its application for hydrophobic drug delivery. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2015; 48:487–498.
19. Faghihian H, Moayed M, Firooz A, Irvani M. Evaluation of a new magnetic zeolite composite for removal of Cs^+ and Sr^{2+} from aqueous solutions: Kinetic, equilibrium and thermodynamic studies. Comptes Rendus Chimie 2014; 17(2):108–117.
20. Fan R, Min H, Hong X, Yi Q, Liu W, Zhang Q, Luo Z. Plant tannin immobilized Fe_3O_4 - SiO_2 microspheres: A novel and green magnetic bio-sorbent with superior adsorption capacities for gold and palladium. J Hazard Mater 2019; 364:780–790.
21. Farghali, MA El-din TAS, Al-enizi AM, Bahnasawy RM. Graphene/Magnetite nanocomposite for potential environmental application. Int J Electrochem Sci 2015; 10:529–537.
22. Gruttner C, Muller K, Teller J, Westphal F. Synthesis and functionalization of magnetic nanoparticles for hyperthermia applications. Int J Hyperther 2013; 29:777–789.
23. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials 2005; 26(18):3995–4021.
24. Hariani PL, Faizal M, Ridwan M, Setiabudidaya D. Synthesis and properties of Fe_3O_4 nanoparticles by co-precipitation method to removal procion dye. Int J Environ Sci Dev 2013; 4(3):336–340.
25. Hoorfar J, Cook N, Malorny B, et al. Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. J Clin Microbiol 2003; 41:5835. doi: 10.1128/JCM.41.12.5835.2003.
26. Hudson SP, Padera RF, Langer R, Kohane DS. The biocompatibility of mesoporous silicates. Biomaterials 2008; 29:4045–4055.
27. Jiang S, Eltoukhy AA, Love KT, Langer R, Anderson DG. Lipidoid-coated iron oxide nanoparticles for efficient DNA and siRNA delivery. Nano Lett 2012; 13:1059–1064.
28. Jouyandeh M, S Paran MRM, Shabani M, Ghiyasi S, Vahabi H, Badawi M, Formela K, Puglia D, Saeb MR. Curing behavior of epoxy/ Fe_3O_4 nanocomposites: A comparison between the effects of bare Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ /chitosan and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ /chitosan/imide/phenylalanine-modified nanofillers. Progress in Organic Coatings 2018; 123:10–19.
29. Kalantari K, Ahmad MB, Fard Masoumi HR, Shameli K, Basri M, Khandanlou R. Rapid adsorption of heavy metals by Fe_3O_4 /talc nanocomposite and optimization study

- using response surface methodology. *Int J Mol Sci* 2014; 15:12913–12927.
30. Lee N, Hyeon T. Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. *Chem Soc Rev* 2012; 41:2575–2589.
 31. Lima TM, Lima CGS, Rathi AK, Gawande MB, Tucek J, Urquieta-Gonzalez EA, Zbořil R, Paixão MW, Varma RS. Magnetic ZSM-5 zeolite: a selective catalyst for the valorization of furfuryl alcohol to γ -valerolactone, alkyl levulinates or levulinic acid. *Green Chem* 2016; 18(20):5586–5593.
 32. Li Y, Li H, Xiao L, Zhou L, Shentu J, Zhang X. Hemostatic efficiency and wound healing properties of natural zeolite granules in a lethal rabbit model of complex groin injury. *Materials* 2012; 5:2586–2596.
 33. Maximchik P, Tamarov K, Sheval EV, Tolstik E, Kirchberger-Tolstik T, Yang Z, Sivakov V, Zhivotovsky B, Osminkina LA. Biodegradable porous silicon nanocontainers as an effective drug carrier for regulation of the tumor cell death pathways. *ACS Biomater Sci Eng* 2019; 5(11):6063–6071.
 34. Nah IW, Hwang K-Y, Jeon C, Choi HB. Removal of Pb ion from water by magnetically modified zeolite. *Miner Eng* 2006; 19(14):1452–1454.
 35. Nah IW, Hwang KY, Shul YG. A simple synthesis of magnetically modified zeolite. *Powder Technol* 2007; 177(2):99–101.
 36. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 2006; 1(3):1559–1582.
 37. Nourmohamadi GH, Fazlavi A, Amiri B, Khadijeh C. Investigation on adsorption of Cu^{+2} onto synthesized magnetite bentonite nano – absorbent by CCD design of experiments. *Bull Georg Natl Acad Sci* 2014; 8:497–503.
 38. Parsonage P. Coating and carrier methods for enhancing magnetic and flotation separations. *Colloid Chem Miner* 1992; 12:331–360.
 39. Rahman IA, Padavettan V. Synthesis of silica nanoparticles by sol-gel: size-dependent properties, surface modification, and applications in silica-polymer nanocomposites. *J Nanomater* 2012; 18:86–90.
 40. Shaker S, Zafarian S, Chakra CS, Rao KV. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles by sol gel method for water treatment. *Int J Innov Res Sci Eng Technol* 2013; 2:969–973.
 41. Sharif F, Gagnon LR, Mulmi S, Roberts EPL. Electrochemical regeneration of a reduced graphene oxide/magnetite composite adsorbent loaded with methylene blue. *Water Res* 2017; 114:237–245.
 42. Spanova A, Horak D, Soudkova E, Rittich B. Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres designed for polymerase chain reactions applications. *J Chromatogr* 2004; 800(1)–2:27–32.
 43. Tadic M, Kralj S, Jagodic M, Hanzel D, Makovec D. Magnetic properties of novel superparamagnetic iron oxide nanoclusters and their peculiarity under annealing treatment. *Applied Surface Science* 2014; 322:255–264.
 44. Teeters MA, Conrardy SE, Thomas BL, et al. Adsorptive membrane chromatography for purification of plasmid DNA. *J Chromatogr A* 2003; 989:165–173.
 45. Wan J, Chen X, Wang Z, Yang X, Qian Y. A soft-template-assisted hydrothermal approach to single-crystal Fe_3O_4 nanorods. *Journal of Crystal Growth* 2005; 276(3):571–576.
 46. Widder KJ, Senyei AE, Scarpelli DG. Magnetic microspheres: A model system for site specific drug delivery in vivo. *Experimental Biology and Medicine* 1978; 158(2):141–146.
 47. Williams MJ, Sanchez ES, Aluri ER, Douglas FJ, MacLaren DA, Collins OM, Cussen EJ, Budge JD, Sanders LC, Michaelis M, Smales CM, Jr LS, Lorrio S, Krueger D, Rosales RTM, Corr SA, Williams MJ. Microwave-assisted synthesis of highly crystalline, multifunctional iron oxide nanocomposites for imaging applications. *RSC Adv* 2016; 6(87):83520–83528.
 48. Yang N, Zhu S, Zhang D, Xu S. Synthesis and properties of magnetic Fe_3O_4 -activated carbon nanocomposite particles for dye removal. *Mater Lett* 2008; 62:645–647.
 49. Zhang H, Kim Y, Dutta PK. Controlled release of paraquat from surface-modified zeolite. *Microporous Mesoporous Mater* 2006; 88(1):312–318.

MAGNETIC SORBENTS: CHARACTERISTICS, MAIN PRODUCTION METHODS, PROPERTIES AND THEIR SCOPE IN BIOMEDICINE

T.V. ZHARNIKOVA, T.V. TARAN, T.V. BERDNIKOVA, I.Yu. BORZDOVA, N.M. SHVETSOVA,
I.N. ZAIKINA, Yu.M. EVCHENKO, V.I. EFREMENKO, M.E. MIKHAILOVA

Stavropol Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Stavropol

The review is devoted to the general characteristics, main methods of preparation, properties and scope of magnetic sorbents in biomedicine, discussion of the priority requirements for magnetic sorbents, their advantages and disadvantages. Magnetic sorbents with a specific composition and properties, developed for each specific case, make it possible to concentrate and quickly and effectively isolate proteins, nucleic acids from a large volume of contaminated samples, avoiding the centrifugation stage. They can

also be used in the treatment of complex diseases as magnetic targeted delivery in medicine, magnetic contrast agents in magnetic resonance imaging.

Keywords: magnetic sorbents (MS), magnetic composite sorbents, nucleic acids, modifiers, immobilization, PCR, DNA, RNA.

Address:

Zharnikova T.V., Ph.D.

Senior researcher, laboratory for training specialists,

Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

E-mail: tvzhara@yandex.ru

Для цитирования:

Жарникова Т.В., Таран Т.В., Бердникова Т.В., Борздова И.Ю., Швецова Н.М., Заикина И.Н., Евченко Ю.М., Ефременко В.И., Михайлова М.Е. Магнитные сорбенты: характеристика, основные способы получения, свойства и их область применения в биомедицине. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(2):87–99.

For citation:

Zharnikova T.V., Taran T.V., Berdnikova T.V., Borzdova I.Yu., Shvetsova N.M., Zaikina I.N., Evchenko Yu.M., Efremenko V.I., Mikhailova M.E. Magnetic sorbents: characteristics, main production methods, properties and their scope in biomedicine. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(2):87–99 (in Russian).

САНИТАРНО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ И ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ ИЗ РЫБЫ СОЦИАЛИСТИЧЕСКОЙ РЕСПУБЛИКИ ВЬЕТНАМ

Л.В. КАТАЕВА*, Т.Ф. СТЕПАНОВА, А.А. ВАКАРИНА, О.В. ПОСОЮЗНЫХ

*ФБУН Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии
Роспотребнадзора, Тюмень*

На экологические пути распространения устойчивости к антибиотикам в последние годы обращено повышенное внимание. Водная среда действует как резервуар или источник устойчивых к антибиотикам бактерий, остатков антимикробных препаратов и комплексов генов резистентности. В связи с этим важно идентифицировать роль загрязненной воды в распространении устойчивости бактерий к антибиотикам. По-прежнему существует большой пробел в понимании генетической основы устойчивости к антибиотикам и вирулентности кишечных бактерий, поступающих в организм человека и животных с пищей. Необходимы исследования объектов окружающей среды для разработки более эффективных мер профилактики высокого риска передачи инфекционных и паразитарных заболеваний пищевого происхождения. Вместе с тем важны и вопросы охраны местообитаний редких и важных для промысла видов гидробионтов.

Ключевые слова: водные объекты, рыба, аквакультура, бактерии, резистентность к антибиотикам, санитарная микробиология, Социалистическая Республика Вьетнам (СРВ).

Введение

За последние два десятилетия Вьетнам претерпел беспрецедентное экономическое и социальное развитие. Происходящие изменения включают в себя быструю урбанизацию, интенсификацию животноводства, модернизацию систем маркетинга пищевых продуктов (переход от стихийных рынков к супермаркетам) и изменения в привычках потребления пищевых продуктов. Эти преобразования, несомненно, оказывают серьезное влияние на воздействие патогенов человека и животных, на риски безопасности пищевых продуктов, следовательно, на общий риск передачи инфекционных и паразитарных заболеваний. Несмотря на значительные инвестиции в усовершенствованные системы эпидемиологического надзора над заболеваниями, информация о кишечных инфекциях в этой стране недоступна. О подозрительных вспышках болезней пищевого происхождения во

Вьетнаме сообщают в Управление по контролю над продуктами питания Вьетнама (VFA) (<http://vfa.gov.vn>). В большинстве случаев этиология кишечных инфекций остается неопределенной, и относительное бремя болезни по сравнению с другими инфекционными заболеваниями не может быть определено количественно [9].

Общий анализ санитарно-бактериологического статуса Республики Вьетнам

Некоторые привычки потребления пищи во Вьетнаме способствуют передаче возбудителей инфекционных заболеваний: наличие скотобоен и стихийных рынков, работающих без соблюдения элементарной гигиены и при отсутствии холодильного оборудования; повсеместное потребление сырой / недоваренной крови, мяса, рыбы, тканей органов, сырых листовых овощей и продуктов дикого животного происхождения; использование сточных вод, в том числе неочищенных, в сельском хозяйстве. По этим причинам Вьетнам и Юго-Восточная Азия часто рассматриваются как очаги возникающих инфекционных заболеваний. Действительно, угрозе появления вирусных патогенов уделяется значительное внимание международного сообщества, в то время как бремя эндемических (преимущественно бактериальных и паразитарных) зоонозов остается в значительной степени игнорированным.

Вьетнам является одним из государств, характеризующимся большим разнообразием водных источников. Внутренние водоёмы республики представлены

© 2023 г. Катаева Л.В., Степанова Т.Ф., Вакарин А.А., Посоюзных О.В.

* Автор для переписки:

Катаева Любовь Владимировна

д.м.н., главный научный сотрудник, заведующий бактериологической лабораторией ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
E-mail: KataevaLV@Tniikip.rosпотребнадзор.ru

реками, озерами, водохранилищами, ледниками и подземными водами. Их суммарная площадь составляет около 6% территории страны, оказывая огромное влияние на экологические аспекты всего Индокитайского полуострова. Современные водохранилища СРВ используются для решения задач в гидроэнергетической отрасли, для противопоаводковой защиты, навигации, ирригации, рыболовства и в других целях. Главным же потребителем воды является сельское хозяйство, использующее ее для орошения полей. Именно благодаря им Вьетнам на протяжении ряда лет удерживает одно из первых мест в мире по объёмам выращивания и экспорта риса. В последние годы интенсивно развиваются пресноводное рыбоводство и выращивание аквакультуры. Искусственно выращенная рыба составляет более половины общего объёма продукции данной отрасли [4, 10, 23].

Красная река — вторая по величине река Вьетнама (после реки Меконг), являющаяся основным источником воды для большей части населения Северного Вьетнама, и одна из пяти крупнейших рек в Восточной Азии. В бассейне Красной реки проживает более 24 миллионов жителей, в том числе более 17 миллионов — в ее дельте. Этот район также характеризуется несколькими крупными промышленными зонами и большим количеством ремесленных деревень и считается очагами биологического и химического загрязнения. Дельта Красной реки (RRD) — важный район производства риса во Вьетнаме, на который приходится 20% национального производства. Это также главный источник пресной воды для прилегающих территорий, а также основной выход сточных вод. Согласно Отчету Управления по охране окружающей среды Вьетнама, городские районы RRD концентрируют 24% национального производства бытовых сточных вод и принимают вторую по величине долю промышленных сточных вод в стране после юго-восточного региона вокруг Хошимина. Несмотря на высокую долю сточных вод, которые ежедневно попадают в Красную реку, в опубликованной литературе имеется мало информации о микробиологических показателях, отражающих уровень фекального загрязнения в этом полутропическом регионе. Бактерии-индикаторы фекалий (FIB) используются для контроля уровня фекального загрязнения и, следовательно, возможности загрязнения патогенами фекального происхождения почвы и воды как в тропических, так и в умеренных зонах. FIB — это общий термин для ряда бактерий, обитающих в желудочно-кишечном тракте человека и животных. В группу FIB

входят *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp. и другие колиформные бактерии. Установлено, что в сезон дождей регистрируется рост количества общих колиформных бактерий (ТС), при этом сезонных различий количества бактерий *E. coli* зафиксировано не было [21].

Во многих карстовых регионах развивающихся стран, в том числе СРВ, население часто подвергается воздействию бактериальных патогенов в связи с низким качеством воды по микробиологическим показателям. В карстовые участки и грунтовые воды микробные загрязнители попадают благодаря быстрой инфильтрации через почвы. Кроме того, уязвимость грунтовых вод сильно возрастает во время ливней. Общая санитарно-микробиологическая оценка сырой воды осуществляется на основе фекальных индикаторных бактерий (FIB), таких как общие колиформные бактерии, фекальные колиформные бактерии (FC), *E. coli* и кишечные энтерококки. Микробиологическое качество воды часто быстро меняется в широком диапазоне, и кратковременные пики концентрации патогена значительно увеличивают риск вспышек заболеваний. Исследование микробиологического загрязнения карстового источника в Северном Вьетнаме очень важно, потому что используется как система водопровода для горных деревень. Необходимость исследования качества воды и влияния поверхностного водосбора обусловлена риском заражения *E. coli*, который увеличивается примерно в 10 раз при увеличении площади речных наносов. В карстовых системах выпадение дождя может вызвать мутность воды, обусловленную ремобилизацией отложений из самого карстового водоносного горизонта (автохтонная мутность) [14].

Антропогенная нагрузка на водные объекты не только влияет на качество воды, но и способствует распространению антибиотикорезистентности бактерий, имеющей в настоящее время глобальный характер.

Конкретные данные о микробиоте Вьетнама

Исследование остаточного количества противомикробных препаратов и микробиоты в 12 пресноводных участках аквакультуры и рек в Кантхо (дельта Меконга) методом ПЦР ВР и метагеномного анализа на основе 16S рДНК показало следующие результаты. Остатки сульфаметоксазола (10/12) и сульфадимидина (7/12) были обнаружены вместе с генами *sul1* (11/12) и *sul2* (9/12), кодирующими резистентность к сульфаниламидам. Кроме того, остатки сульфаметоксазола и β -лактамазы (ген устойчивости *blaCTX-M-1*) были обнаружены в восьми пресноводных системах (8/12),

что позволяет предположить, что эти пресноводные системы могли быть загрязнены продуктами жизнедеятельности человека. Метагеномный анализ показал, что все протестированные пресноводные системы содержали типы *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Bacteroidetes*, что составило 64% от общей микробиоты. Кроме того, в воде участка реки Кайранг, который расположен в месте слияния сточных вод садоводческих хозяйств, найдены бактерии родов *Polynucleobacter*, *Variovorax* и *Limnohabitans*, составляющие более 78,4% от общей микробиоты. Результаты обнаружения генов резистентности (ARG) показали, что большая часть проб воды пресноводной системы содержат: blaCTX-M-1, blaCTX-M-9, blaTEM, blaSHV, tetC, sul1 и sul2. В одной пробе воды sul1 ген был единственным геном. Общее количество бактерий было определено на основе анализа 16S рРНК, и результаты продемонстрировали, что пробы воды исследованных участков констатировали различные уровни бактериального загрязнения. Интересно, что выявлена корреляция между наличием генов sul1 и tetC; кроме того, tetM также коррелировал с blaCTX-M-9, blaTEM и blaSHV. В этом исследовании установлено, что остатки антимикробных препаратов циркулируют в пресноводных системах вместе с генами blaCTX-M-1, blaCTX-M-9, blaTEM, tetC и sul1. В предыдущих исследованиях микробиоты водных объектов было показано, что бактериальные изоляты, такие как *Salmonella* spp., *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. и *E. coli* были выделены из аквакультуры и речных рыб в дельте Меконга и содержали различные ARG. Кроме того, гены tet, связанные с устойчивостью к тетрациклину, были определены в отложениях реки Меконг, в аквакультуре и в пробах воды из реки. Таким образом, эти данные позволяют предположить, что сточные воды от аквакультуры на частных подворьях могут повлиять на присутствие генов резистентности к антимикробным препаратам в реках [20, 24, 26].

Во всем мире зарегистрировано распространение бактерий *Vibrio parahaemolyticus*, являющихся патогеном для человека. Большинство зарегистрированных случаев этой инфекции связано с употреблением в пищу морепродуктов. *V. parahaemolyticus* — грамотрицательная галофильная бактерия, являющаяся важным возбудителем пищевых отравлений человека. Ген tdh, кодируемый термостабильным прямым гемолизинном (TDH), и ген trh, кодируемый TDH-родственным гемолизинном, считаются важнейшими вирулентными факторами патогенности для человека. Во Вьетнаме инфицирование человека *V. parahaemolyticus* реги-

стрируется с 1983 года. Вспышка *V. parahaemolyticus* с преобладанием штамма O3:K6 (1997–1999 гг.) была зарегистрирована в Нячанге, среднем регионе Вьетнама. Известно, что *V. parahaemolyticus* был изолирован у 8,3% пациентов с острой диареей на юге Вьетнама в 2010 г. Выделенные штаммы имели ген tdh или trh и обнаруживались в 41,7% случаев. В новом столетии большое количество морепродуктов производится в дельте Меконга на юге Вьетнама. Тем не менее информация о распространенности *V. parahaemolyticus* в этой области до конца не изучена. Вместе с тем показано, что эти штаммы обладали резистентностью к антибиотикам: стрептомицину — 22 (84,6%); ампициллину — 15 (57,7%); сульфизоксазолу — 15 (57,7%); канамицину — 2 (7,7%); резистентности к хлорамфениколу, гентамицину, налидиксовой кислоте, офлоксацину и тетрациклину не выявлено [29].

Аналогичные исследования циркуляции бактерий *V. parahaemolyticus* в объектах окружающей среды дельты Меконга были проведены в 2015 и 2016 гг. Показано, что из 385 проб морепродуктов 332 (86,2%) и из 64 проб воды — 25 (6,5%) были загрязнены этими бактериями, причем, несущими гены tdh и /или trh. Ген tdh был обнаружен в 22 (5,7%) штаммах *V. parahaemolyticus*, а ген trh — в 5 (1,3%). Из 25 патогенных штаммов *V. parahaemolyticus* в двух штаммах присутствовали оба гена tdh и trh, а остальные 23 штамма несли ген tdh или trh. Из 64 проб воды, отобранных в аквакультурных хозяйствах, 50 (78,1%) образцов были контаминированы *V. parahaemolyticus*. Штаммов *V. parahaemolyticus* с положительным геном tdh обнаружено не было. Между тем ген trh был выявлен в 1 (1,6%) штамме. Выделенные штаммы *V. parahaemolyticus* были разделены на 6 типов по O-антигену, серотип O3:K6 был найден у 4 штаммов. В результате теста на чувствительность к противомикробным препаратам выяснено, что патогенные штаммы имели высокие показатели устойчивости к стрептомицину, ампициллину и сульфизоксазолу. Эти данные указывают на микробиологический риск морепродуктов в дельте Меконга [29].

Устойчивость бактерий к антибиотикам и сульфаниламидам

Повсеместное применение и выброс антибиотиков в окружающую среду может привести к формированию бактерий, представляющих серьезный риск для людей и животных. Страны Юго-Восточной Азии обычно применяют интегрированную систему переработки отходов под названием VAC (овощи, аквакультура и животноводческие фермы). В среде VAC антибиотики

выделяются от животных и людей, что способствует формированию антибиотикорезистентности бактерий (ARB). Проведена оценка частоты обнаружения ARB в среде VAC в Северном Вьетнаме с количественным анализом загрязнения антибиотиками. Установлено, что сульфаниламиды были определены во всех пробах. В «сухой» сезон, когда сульфаметазин являлся основным загрязнителем пруда свинофермы (475–6662 нг/л), он был менее распространен в городских каналах и на участках аквакультуры, а в городском канале основным был сульфаметоксазол (612–4330 нг/л). Макролиды (эритромицин (154–2246 нг/л) и кларитромицин (2,8–778 нг/мл)) были обнаружены в городском канале, но в прудах свинофермы и аквакультурах отмечены очень низкие их концентрации. Часто отмечались штаммы бактерий, устойчивые к сульфаметоксазолу (2,14–94,44%), тогда как частота встречаемости бактерий, устойчивых к эритромицину, была ниже (0,01–38,8%). Констатируется положительная корреляция между концентрацией сульфаметоксазола и наличием устойчивых к сульфаметоксазолу бактерий в «сухой» сезон. Установлено, что устойчивые к сульфаметоксазолу изоляты принадлежали к 25 родам: *Acinetobacter* и *Aeromonas* были основными. Двадцать три из 25 родов содержали гены *sul*. Это исследование показало закономерности специфического загрязнения городской окружающей среды VAC, являющейся резервуаром генов лекарственной устойчивости и в которой животные и люди служат источниками ARB и генов устойчивости.

Предполагается, что появление ARB связано с состоянием осадков и горизонтальным переносом генов в разнообразном микробном сообществе. Изучен видовой состав 121 изолята в январе, что коррелировало с загрязнением. Эти изоляты были идентифицированы и отнесены к 25 родам. Среди идентифицированных бактерий род *Acinetobacter* был самым распространенным (24%), за ним следовали *Aeromonas* spp. (19,8%), *Bacillus* spp. (13,2%) и *Pseudoalteromonas* spp. (10%); другие бактериальные роды занимали менее 10% в общей структуре. Основным на свиноводческих фермах и рыбоводных прудах были *Acinetobacter* spp., тогда как аэромонады были обнаружены в основном в городском канале. Показано, что пруд с креветками имел большое разнообразие по микробному сообществу. Обнаружены в общей сложности 23 рода бактерий, несущих гены *sul1*, *sul2* или *sul3*, среди них: *Pseudoalteromonas*, *Halobacillus*, *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Microbacterium*, *Rheinheimera*, *Agrococcus*, *Cellulosimicrobium*, *Sandaracinobacter*,

Tenacibaculum, *Uruburuella* и *Wautersiella*. Результаты исследования участков свиноферм, рыбоводных прудов и прудов с креветками выявили большее видовое разнообразие бактерий, чем из городских каналов. Сульфаниламиды, особенно сульфаметоксазол (SMX) и сульфаметазин, интенсивно используемые в сезон дождей, были основными загрязнителями в городских каналах, свинофермах и рыбоводных прудах [6, 27]. Триметоприм использовался как комбинированный препарат с SMX. Макролиды были обнаружены в городском канале, что указывает на их частое применение людьми. Это исследование впервые показало взаимосвязь загрязнения водных объектов лекарственными средствами и разнообразие ARB в дождливое и засушливое время года [17].

Проблема культивирования гидробионтов

Во всем мире стремительно возрастает роль культивируемых гидробионтов как источника ценного и относительно дешевого белка. Двустворчатые моллюски, в том числе мидии и устрицы, являясь фильтраторами, прокачивают через свой организм огромные количества воды, до 7,5 л/ч, для обеспечения организма достаточным количеством пищи и кислорода. Культивируемые организмы трансформируют среду своего обитания, изменяя состав микробиоты и субстрата. Они высвобождают в водную толщу массу питательных веществ и накапливают связанные с плотными частицами поллютанты. Искусственно выращиваемые беспозвоночные животные могут аккумулировать опасные для человека и гидробионтов бактериальные патогены, являясь резервуаром вибрионов [1, 2].

Из двух видов двустворчатых моллюсков, культивированных в заливе Нячанг (Вьетнам), и проб воды марикультурного хозяйства выделено и охарактеризовано 104 штамма гетеротрофных бактерий. Показано, что в составе микрофлоры моллюсков преобладали вирионы *Vibrio alginolyticus*; также обнаружены патогенные виды *V. harveyi* и *V. splendidus*. Второе место по численности после вибрионов занимали стафилококки и бациллы. Кроме того, выявлены коринеформные и энтеробактерии, а также *Pseudomonas* spp. и *Pseudoalteromonas* spp. Состав микрофлоры воды отличался более высоким видовым разнообразием по сравнению с микрофлорой моллюсков. Преобладающими в воде были бактерии *Bacillus* spp., *Vibrio* spp. и *Pseudomonas* spp. В значительном количестве встречались *Brevibacterium* spp. и другие коринеформные бактерии и энтеробактерии. Помимо них отмечены *Pseudoalteromonas* spp., *Marinococcus* spp., *Halobacillus* spp., *Shewanella* spp.,

Sulfitobacter spp. и бактерии СФВ-кластера. Обнаруженные патогенные и условно патогенные виды бактерий в воде и моллюсках, по-видимому, являются причиной высокой смертности культивируемых животных в марикультурном хозяйстве. Бактерии группы кишечной палочки (БГКП) стабильно выявлялись как в пробах воды, так и в организмах моллюсков, мидий. Состав микрофлоры воды лагуны марикультурного хозяйства был значительно разнообразнее микрофлоры культивируемых там моллюсков. Этот факт дает основание полагать, что не все виды бактерий из водной среды развиваются в моллюсках [1].

Gastropoda — это большой класс моллюсков в прибрежных водах центральной части Вьетнама. Взаимодействие между микроорганизмами и брюхоногими в основном состоит из симбиотических и паразитических отношений. Из 12 образцов брюхоногих, включающих в себя 3 вида: *Trochus maculatus*, *Cypraea eglantica*, *Chicoreus bruneus*, изолирован 101 штамм микроорганизмов, из них 79 штаммов бактерий (78,2 %), 18 штаммов дрожжей (17,8 %) и 4 штамма актиномицетов (4,0 %). Было отобрано 15 штаммов (включая 8 штаммов дрожжей, 5 штаммов бактерий и 2 штамма актиномицетов) для идентификации на основе анализа последовательностей геномов и гена 16S рРНК (бактерии и актиномицеты) [5]. Зарегистрировано 125 видов литоральных макробеспозвоночных, обитающих в реке Меконг, Вьетнам. Состав этих сообществ в основном относится к 3 типам: *Mollusca*, *Arthropoda* и *Annelida*. *Mollusca* оказался наивысшим доминантом в сообществах с 45 процентами от общего числа видов [25].

На рыбных хозяйствах Вьетнама (2017 г.) были проведены исследования азиатской тигровой креветки (*Penaeus monodon*) и белоногой креветки (*Penaeus vannamei*) на наличие в них энтеробактерий (СРЕ), продуцирующих карбапенемазы. Выделен штамм *Enterobacter cloacae* (3568) устойчивый к ампициллину, цефокситину и карбапенемам, но проявлял чувствительность к цефалоспорином третьего и четвертого поколений. Полногеномное секвенирование штамма определило единственный ген устойчивости — blaIMI-1. Сравнение с другими изолятами *Enterobacter*, кодирующими blaIMI-1, показало, что ген присутствует на предполагаемом мобильном генетическом элементе EcloIMEX. Большинство карбапенемаз обладает гидролитической активностью в отношении цефалоспоринов третьего и четвертого поколений, и в нескольких исследованиях сообщается об устойчивости к карбапенемам, но изоляты проявляли чувствительность к цефалоспорином. Элементы EcloIMEX,

по-видимому, распространяются горизонтально среди генетически различных штаммов *Enterobacter*. Все ранее описанные изоляты, содержащие элементы EcloIMEX, были получены из клинических образцов человека, а штамм 3568 был выделен из креветок, выращиваемых в географически отдаленных местностях. Известно, что морепродукты, импортируемые из Юго-Восточной Азии, содержат микроорганизмы, продуцирующие карбапенемазы. Однако такие гены устойчивости часто кодируются генетически и у непатогенных бактерий, поэтому не представляют особой причины для беспокойства с точки зрения общественного здравоохранения. Так, blaVIM-1 был найден в плазмиде *Escherichia coli*, а blaIMI-1 был определен в геноме штамма *E. cloacae*. Эти данные нацеливают на проведение мониторинговых исследований морепродуктов [8].

Анализ рыбопродуктов и рыбохозяйств

В общей сложности во Вьетнаме описано свыше 2700 видов рыб (Froese, Pauly, 2012; Eschmeyer, 2013). Это внушительная величина, которая составляет около 9% всех известных на сегодняшний день видов рыб, обитающих на Земле. Самым многочисленным семейством пресноводных рыб Вьетнама являются карповые (*Cyprinidae*) — 285 видов или 31% всей пресноводной ихтиофауны страны. В бассейнах основных крупных рек, состоящих из водоёмов разного типа, ситуация сходная. В частности, карповые рыбы составляют около 35% ихтиофауны бассейна Меконга. В большинстве пресноводных водоёмов Вьетнама ихтиофауна тесно связано с придонными слоями воды и самим дном [3].

Существует множество факторов, которые могут повлиять на микробную экологию и качество замороженной рыбы во время переработки во Вьетнаме, в частности, филе *Pangasius hypophthalmus*. Наличие бактерий, вызывающих порчу на технологической линии сокращает сроки хранения размороженных и замороженных рыбных продуктов. Микробиота порчи на всех этапах технологической цепочки может быть идентифицирована методом секвенирования гена 16S рРНК. Проведение микробиологических исследований на технологических этапах обработки рыбы показало, что общее микробное число незначительно различались ($p > 0,05$) при обработке филе хлором и обработанное питьевой водой, что явилось результатом неправильного температурного режима. Всего идентифицировано 174 изолята, 20 родов и 38 видов. На различных этапах обработки преобладали бактерии родов *Aeromonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Lactococcus* spp. и *Enterococcus* spp..

Из филе, отобранного на технологических линиях, был выделен разнообразный спектр изолятов, принадлежащих к *Enterobacteriales*, таких родов, как *Providencia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter* и *Wautersiella*. Полученные результаты могут быть использованы для улучшения надлежащей производственной практики переработки и выбора эффективных мер по продлению срока хранения размороженного вьетнамского филе пангасиуса. Помимо общего микробиологического числа, высокое разнообразие видов могут отражать потенциальную опасность пищевых продуктов. Улучшение качества рыбной продукции должно идти по пути оценки эффективности систем менеджмента качества, внедренных в этих компаниях [7, 12, 28].

Бактерии рода *Aeromonas* обычно встречаются в пресноводных, эстуарных и морских средах. Представители этого рода находятся в центре внимания, так как являются патогенами не только рыб, земноводных и рептилий, но и млекопитающих, включая человека. Среди видов *Aeromonas*, вызывающих заболевания рыб, *A. hydrophila* была идентифицирована как один из наиболее опасных патогенов, вызывающих вспышки заболеваемости среди различных видов культивируемых рыб. Результаты исследования генов вирулентности и устойчивости к противомикробным препаратам бактерий *A. hydrophila* (236 штаммов), изолированных из культивируемых пресноводных рыб в Северном Вьетнаме, свидетельствуют о том, что в общей сложности 88,9% изолятов *A. hydrophila* содержат по одному из протестированных генов вирулентности. Наиболее часто встречались гены *aerA* и *act* (80,5 и 80,1% соответственно), тогда как *ast* ген отсутствовал у всех изолятов. Резистентность к оксациллину, амоксициллину и ванкомицину проявлялась наиболее часто (>70%), за ними следовали эритромицин, тетрациклин, хлорамфеникол и сульфаметоксазол/триметоприм (9,3–47,2%) [22].

На основании теста на профили мультирезистентности *A. hydrophila* были обнаружены: 90,9% изолятов чувствительны к флорфениколу и доксициклину; 68,18% были чувствительны к окситетрациклину, норфлоксацину и ципрофлоксацину; 63,63% были чувствительны к сульфаметоксазол/триметоприму, тогда как только 27,27 и 4,5% были чувствительны к эритромицину и цефрадину; кроме того, все изоляты были устойчивы к амоксициллину и ампициллину [13].

Бактерии *Aeromonas veronii* были определены как новый и потенциально заслуживающий внимания вид рода *Aeromonas*, который, как сообщается, вызывает

вспышки гибели у различных рыб, включая тилапию, европейского морского окуня, сома и других [11, 15, 16].

Значение бактериофагов в контексте настоящего обзора

Для борьбы с массовой гибелью на вьетнамских рыбноводных хозяйствах полосатого сома (*Pangasianodon hypophthalmus*) из-за инфекций, вызываемых *Aeromonas* spp., изолированы бактериофаги патогенной *A. hydrophila*. Из проб воды реки Сайгон в городе Хошимине были выделены *A. hydrophila*-phage 2 и *A. hydrophila*-phage 5. Обнаружено, что эти фаги, принадлежащие к семейству *Myoviridae*, обладают широким спектром активности против испытанных изолятов *Aeromonas* spp. с множественной устойчивостью к антибиотикам. Бактериофаги доказали свою эффективность в подавлении роста *Aeromonas* spp. в лабораторных условиях. Обработка фагами патогенных штаммов, изолированных от сомов с признаками воспаления, привела к значительному улучшению выживаемости подопытных рыб до 100% по сравнению с выживаемостью 18,3%, наблюдаемой в контрольных экспериментах. Всего 360 здоровых сомов (*Pangasianodon hypophthalmus*) (весом 30 г) были разделены на 12 групп в 50-литровых пластиковых резервуарах при 30 ± 1 °C. Всех экспериментальных рыб инфицировали внутрибрюшинно *A. hydrophila* N17 (конечная концентрация $3,2 \times 10^6$ КОЕ/рыбу), а затем немедленно вводили коктейль фагов (МОИ 0,01, 1 и 100). Положительный контроль состоял из рыб, которым вводили только *A. hydrophila* N17. Отрицательным контролем 1 и 2 были рыбы без инъекции и рыбы, которым вводили жидкость, отделенную от бульона, содержащего бактерии и среду, соответственно. Смешанный препарат фага состоял из *A. hydrophila*-phage 2 и *A. hydrophila*-phage 5. Уровень гибели рыб регистрировали каждые 12 ч в течение восьми дней, мертвых и выживших рыб подвергали бактериологическому исследованию. Выделение бактерий было проведено из всех мертвых рыб, что указывает на то, что смерть была вызвана *A. hydrophila*. Таким образом, фаги *A. hydrophila*-phage 2 и *A. hydrophila*-phage 5 показали торможение роста тестируемых штаммов *A. hydrophila*. Результаты, полученные при использовании коктейля из фагов, свидетельствуют, что фаги могут успешно использоваться для лечения инфекций *Aeromonas* spp. у сомов путем внутрибрюшинной инъекции. Эти данные демонстрируют возможность использования фагов в качестве эффективного метода биологической обработки для борьбы с *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) на рыбных фермах и использования бактериофагов для эффективного контроля заболеваний в

аквакультуре. Следовательно, фаги могут рассматриваться как потенциальные агенты биоконтроля для борьбы с инфекциями *Aeromonas* spp. [18].

Устойчивость к противомикробным препаратам и вирулентность кишечной палочки

Для изучения текущего исходного профиля устойчивости к противомикробным препаратам и вирулентности *E. coli*, выделенной из пищевых продуктов, было проведено исследование проб продуктов, обычно продаваемых на рынке во Вьетнаме. Из 180 образцов сырого мяса, птицы, рыбы и моллюсков было выделено 99 изолятов *E. coli* и проведено исследование их чувствительности к 15 антимикробным препаратам методом дисковой диффузии. Устойчивыми к одному или нескольким антибиотикам оказались 84,0% изолятов, а множественная устойчивость, определялась, как минимум, к трем различным классам антибиотиков. Показатели множественной устойчивости составляли до 89,5%. Устойчивость чаще всего наблюдалась к тетрациклину (77,8%), сульфату сульфазола (60,6%), ампициллину (50,5%), амоксициллину (50,5%), триметоприму (51,5%), хлорамфениколу (43,4%), стрептомицину (39,4%), налидиксовой кислоте (34,3%) и гентамицину (24,2%). Кроме того, изоляты также проявляли устойчивость к фторхинолонам (ципрофлоксацин 16,2%, норфлоксацин 17,2% и энрофлоксацин 21,2%); при этом куриные изоляты дали самые высокие показатели устойчивости к этим антибиотикам (52,6–63,2%). Изоляты с множественной устойчивостью были отобраны для изучения генов резистентности и генов вирулентности с помощью мультиплексной и униплексной полимеразной цепной реакции. Ген бета-лактама TEM и гены тетрациклиновой устойчивости (*tetA*, *tetB*) часто выявлялись в тестируемых изолятах (84,2 и 89,5% соответственно). Гены, ответственные за устойчивость к стрептомицину (*aadA*) (68,4%), хлорамфениколу (*cmlA*) (42,1%), сульфонидам (*sulI*) (39,5%), триметоприму (*dhfrV*) (26,3%) и канамицину (*aphA-1*) (23,7%), также были широко распространены. Плазмидно-опосредованные гены *ampC* были обнаружены в изолятах *E. coli* из куриного мяса и свинины. Изоляты были протестированы на наличие 58 генов вирулентности в отношении адгезинов, токсинов, капсульного синтеза, сидерофоров, инвазинов и других генов различных патотипов *E. coli*. Все протестированные изоляты содержали, по крайней мере, один ген вирулентности из 16. Обнаружены гены вирулентности: *fimH* (92,1%), *bmaE* (84,2%), *TSPE4.C2* (42,1%), *aidA* *AIDA-I* (*orfB*) (31,6%), *east1* (26,3%), *traT* (23,7%) и другие, в

том числе, *iutA*, *chuA*, *yjaA*, *iss*, *iroN*, *ibeA*, *aah* (*orfA*), *iha* и *papG* аллель III (10,5–2,6%). Типичные гены токсинов, продуцируемые энтерогеморрагическими и энтеротоксигенными патотипами *E. coli* (термостабильный токсин (ST), термолabile токсин (LT) и токсин Shiga *stx1*, *stx2*), не были обнаружены ни в одном из этих изолятов. Исследование показало, что наличие *E. coli* в сырой пище является важным резервуаром генов устойчивости и вирулентности. Противомикробные препараты, вводимые домашней птице, могут быть причиной высоких показателей устойчивости, а высокая численность особей птицеводческих хозяйств способствует распространению генов антибиотикорезистентности и вирулентности между популяциями. Кроме того, высока вероятность контаминации водных объектов (сточные воды птицефабрик и животноводческих ферм) штаммами *E. coli*, носителями генов вирулентности и антибиотикорезистентности [12, 30].

Минимизировать вероятность горизонтального переноса генов устойчивости к противомикробным препаратам между бактериями в пищевой цепи позволят проведение строгого надзора и усовершенствование методов ведения сельского хозяйства. Поэтому обучение работников пищевой промышленности безопасному обращению с пищевыми продуктами и правильному приготовлению пищи важно для снижения или устранения риска, связанного с устойчивостью к антибиотикам и патогенными бактериями, содержащимися в сырых продуктах. Кроме того, рекомендуется строго регулировать использование антибиотиков в кормах для животных. По-прежнему существует большой пробел в понимании генетической основы устойчивости к антибиотикам и вирулентности кишечных бактерий, поступающих с пищей. Решение этих задач позволит разработать более эффективные меры профилактики болезней пищевого происхождения [12, 19, 30].

Заключение

Значительная плотность населения страны, стремительно развивающаяся промышленность, сельское хозяйство, высокая доля сточных вод, которая ежедневно попадает в водные артерии и т.д., приводят к существенной антропогенной нагрузке на водные экосистемы Вьетнама. Сложившаяся ситуация требует тщательного изучения процессов, происходящих в пресноводных экосистемах, разработки критериев качества воды и принципов охраны местообитаний редких и важных для промысла видов гидробионтов.

Литература

1. Беленева И.А., Жукова Н.В., Лан Ле Х., Нгуен Тран Д.Х. Таксономический состав микрофлоры, ассоциированный с культивируемыми моллюсками *Crassostrea lugubris* и *Perna viridis* и с водой в лагуне залива Нячанг, Вьетнам // Микробиология. — 2007. — Т. 76. — № 2. — С. 253–262.
2. Беленева И.А. Вибриофлора гидробионтов и воды заливов Петра Великого (Японское море) и Нячанг (Южно-Китайское море) // Биология моря. — 2020. — Т. 46. — № 5. — С. 338–348.
3. Зворыкин Д.Д., Динь Тхи Хай Йен, Во Тхи Ха. Экология внутренних вод Вьетнама. — Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2014. — С. 225–240.
4. Павлов Д.С., Зворыкин Д.Д., Комов В.Т., Нгуен Тхи Хай Тхань. Экология внутренних вод Вьетнама. — Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2014. — С. 389.
5. Тьу Т.Б., До Т.Х., Ле С.Т., Нго К.К., Фам Т.Х., Хоанг Т.Э., Нгуен Т.Т., Бритаев Т.А. Биоразнообразие микробных сообществ некоторых видов класса Гастропода, распространенного в прибрежных водах в центральной части Вьетнама // Вестник РУДН. — Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. — 2019. — Т. 27. — № 1. — С. 29–38.
6. Amir R., Sahu N.P., Subodh G., Aklakur Md. Prospects of medicated feed in aquaculture // Nutr. Food Sci. Int. J. — 2017. — Vol. 3. — No. 4. — Art. 555617. doi: 10.19080/NFSIJ.2017.03.555617.
7. Binh V.N., Dang N., Anh N.T.K., Ky L.X., Thai P.K. Antibiotics in the aquatic environment of Vietnam: Sources, concentrations, risk and control strategy // Chemosphere. — 2018. — Vol. 197. — P. 438–450.
8. Brouwer M.S.M., Rapallini M., Geurts Y., Harders F., Bossers A., Mevius D.J., Wit B., Veldman K.T. Enterobacter cloacae complex isolated from shrimps from Vietnam carrying bla_{IMI-1} resistant to carbapenems but not cephalosporins // Antimicrob Agents Chemother. — 2018. — Vol. 62. — No. 7. — e00398–18. doi:10.1128/AAC.00398-18.
9. Carrique-Mas J.J., Bryant J.E. A review of foodborne bacterial and parasitic zoonoses in Vietnam // EcoHealth. — 2013. — Vol. 10. — No. 4. — P. 465–489.
10. Chambers J.A., Crumlish M., Comerford D.A., Phuoc L.H., Phuong V.H., O'Carroll R.E. Understanding vaccine hesitancy in Vietnamese fish farmers // Antibiotics. — 2022. — Vol. 11. — No. 7. — Art. 878. doi: 10.3390/antibiotics11070878.
11. Coyne L., Benigno C., Giang V.N., Huong L.Q., Kalpravidh W., Padungtod P., Patrick I., Ngoc P.T., Rushton J. Exploring the socioeconomic importance of antimicrobial use in the Small-Scale Pig Sector in Vietnam // Antibiotics. — 2020. — Vol. 9. — No. 6. — Art. 299. doi: 10.3390/antibiotics9060299.
12. Duong H.A., Phung T.V., Nguyen T.N., Phan Thi L.A., Pham H.V. Occurrence, distribution, and ecological risk assessment of antibiotics in selected urban lakes of Hanoi, Vietnam // J. Anal. Methods Chem. — 2021. — Vol. 2021. — Art. 6631797. doi: 10.1155/2021/6631797.
13. El-Bahar H.M., Ali N.G., Aboyadak I.M., Khalil SAES, Ibrahim M.S. Virulence genes contributing to *Aeromonas hydrophila* pathogenicity in *Oreochromis niloticus* // Int. Microbiol. — 2019. — Vol. 22. — No. 4. — P. 479–490.
14. Ender A., Goepfert N., Grimmeisen F., Goldscheider N. Evaluation of β -D-glucuronidase and particle-size distribution for microbiological water quality monitoring in Northern Vietnam // Science of the Total Environment. — 2017. — Vol. 580. — P. 996–1006.
15. Harada K. Antibiotic residue in environmental water in Vietnam // Yakugaku zasshi. — 2018. — Vol. 138. — No. 3. — P. 271–275.
16. Hoai T.D., Trang T.T., Van Tuyen N., Giang N.T.H., Van Van K. *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in channel catfish in Vietnam // Aquaculture. — 2019. — Vol. 513. — Art. 734425. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734425.
17. Hoa P.T., Managaki S., Nakada N., Takada H., Shimizu A., Anh D.H., Viet P.H., Suzuki S. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam // Science of the Total Environment. — 2011. — Vol. 409. — No. 15. — Art. 2894–2901. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.04.030.
18. Le T.S., Nguyen T.H., Vo H.P., Doan V.C., Nguyen L., Tran M.T., Tran T.T., Southgate P.C., Kurtböke D.İ. Protective effects of bacteriophages against *Aeromonas hydrophila* causing Motile *Aeromonas* Septicemia (MAS) in striped catfish // Antibiotics. — 2018. — Vol. 7. — No. 1. — Art. 16. doi.org/10.3390/antibiotics7010016.
19. Mitchell M.E.V., Alders R., Unger F., Nguyen-Viet H., Le T.T.H., Toribio J.A. The challenges of investigating antimicrobial resistance in Vietnam — what benefits does a One Health approach offer the animal and human health sectors? // BMC Public Health. — 2020. — Vol. 20. — No. 1. — Art. 213. doi: 10.1186/s12889-020-8319-3.
20. Nakayama T., Tuyet Hoa T.T., Harada K., Warisaya M., Asayama M., Hinenoya A., Lee J.W., Phu T.M., Ueda S., Sumimura Y., Hirata K., Phuong N.T., Yamamoto Y. Water metagenomic analysis reveals low bacterial diversity and the presence of antimicrobial residues and resistance genes in a river containing wastewater from backyard aquacultures in the Mekong Delta, Vietnam // Environ. Pollut. — 2017. — Vol. 222. — P. 294–306.
21. Nguyen H.T., Le Q.T., Garnier J., Janeau J.L., Rochelle-Newall E. Seasonal variability of faecal indicator bacteria numbers and die-off rates in the Red River basin, North Vietnam // Sci. Rep. — 2016. — Vol. 6. — Art. 21644. doi: 10.1038/srep21644.
22. Ninh D.T., Le D.V., Van K.V., Huong Giang N.T., Dang L.T., Hoai T.D. Prevalence, virulence gene distribution and alarming the multidrug resistance of *Aeromonas hydrophila*

- associated with disease outbreaks in freshwater aquaculture // *Antibiotics* (Basel). – 2021. – Vol. 10. – No. 5. – P. 532. doi: 10.3390/antibiotics10050532.
23. Pham-Duc P., Cook M.A., Cong-Hong H., Nguyen-Thuy H., Padungtod P., Nguyen-Thi H., Dang-Xuan S. Knowledge, attitudes and practices of livestock and aquaculture producers regarding antimicrobial use and resistance in Vietnam // *PLoS One*. – 2019. – Vol. 14. – No. 9. – e0223115. doi: 10.1371/journal.pone.0223115.
 24. Pham D.K., Chu J., Do N.T., Brose F., Degand G., Delahaut P., De Pauw E., Douny C., Nguyen K.V., Vu T.D., Scippo M.L., Wertheim H.F. Monitoring antibiotic use and residue in freshwater aquaculture for domestic use in Vietnam // *Ecohealth*. – 2015. – Vol. 12. – No. 3. – P. 480–489.
 25. Quang N.X., Nguyen V.S., Nguyen D.T., Pham V.L., Ngo T.L. Biodiversity of littoral macroinvertebrates in the Mekong river // *Tạp chí KHOA HỌC ĐHSPTPHCM*. – 2013. – Vol. 51. – P. 16–28.
 26. Schar D., Klein E.Y., Laxminarayan R., Gilbert M., Van Boeckel T.P. Global trends in antimicrobial use in aquaculture // *Sci. Rep.* – 2020. – Vol. 10. – Art. 21878. doi: 10.1038/s41598-020-78849-3.
 27. Ström G.H., Björklund H., Barnes A.C., Da C.T., Nhi N.H.Y., Lan T.T., Magnusson U., Norman Haldén A., Boqvist S. Antibiotic use by small-scale farmers for freshwater aquaculture in the Upper Mekong Delta, Vietnam // *J. Aquat. Anim. Health*. – 2019. – Vol. 31. – No. 3. – P. 290–298.
 28. Tong Thi A.N., Noseda B., Samapundo S., Nguyen B.L., Broekaert K., Rasschaert G., Heyndrickx M., Devlieghere F. Microbial ecology of Vietnamese Tra fish (*Pangasius hypophthalmus*) fillets during processing // *Int. J. Food Microbiol.* – 2013. – Vol. 167. – No. 2. – P. 144–152. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.010.
 29. Tran T.H.T., Yanagawa H., Nguyen K.T., Hara-Kudo Y., Taniguchi T., Hayashidani H. Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood and water environment in the Mekong Delta, Vietnam // *J. Vet. Med. Sci.* – 2018. – Vol. 80. – No. 11. – P. 1737–1742. doi: 10.1292/jvms.18-0241.
 30. Van T.T., Chin J., Chapman T., Tran L.T., Coloe P.J. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes // *Int. J. Food Microbiol.* – 2008. – Vol. 124. – No. 3. – P. 217–223. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.029.
 2. Beleneva IA. Vibrioflora gidrobiontov i vody zalivov Petra Velikogo (Yaponskoye more) i Nyachang (Yuzhno-Kitayskoye more). *Biologiya morya* 2020; 46(5):338–348 (in Russian).
 3. Zvorykin DD, Din' Tkhi Khay Yyen, Vo Tkhi Kha. *Ekologiya vnutrennikh vod V'yetnama*. Moskva: Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy KMK, 2014: 225–240 (in Russian).
 4. Pavlov DS, Zvorykin DD, Komov VT, Nguyen Tkhi Khay Tkhan'. *Ekologiya vnutrennikh vod V'yetnama*. Moskva: Tovarishchestvo nauchnykh izdaniy KMK, 2014: 389 (in Russian).
 5. T'u TB, Do TKH, Le ST, Ngo KK, Fam TKH, Khoang TZ, Nguyen TT, Britayev TA. Bioraznoobrazie mikrobnikh soobshchestv nekotorykh vidov klassa Gastropoda, rasprostrannogo v pribrezhnykh vodakh v tsentral'noy chasti V'yetnama. *Vestnik RUDN. Seriya: Ekologiya i bezopasnost' zhiznedeyatel'nosti* 2019; 27(1):29–38 (in Russian).
 6. Amir R, Sahu NP, Subodh G, Aklakur Md. Prospects of medicated feed in aquaculture. *Nutr Food Sci Int J* 2017; 3(4):555617. doi: 10.19080/NFSIJ.2017.03.555617.
 7. Binh VN, Dang N, Anh NTK, Ky LX, Thai PK. Antibiotics in the aquatic environment of Vietnam: Sources, concentrations, risk and control strategy. *Chemosphere* 2018; 197:438–450.
 8. Brouwer MSM, Rapallini M, Geurts Y, Harders F, Bossers A, Mevius DJ, Wit B, Veldman KT. Enterobacter cloacae complex isolated from shrimps from Vietnam carrying bla_{IMI-1} resistant to carbapenems but not cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62(7). – e00398–18. doi:10.1128/AAC.00398-18.
 9. Carrique-Mas JJ, Bryant JE. A review of foodborne bacterial and parasitic zoonoses in Vietnam. *EcoHealth* 2013; 10(4):465–489.
 10. Chambers JA, Crumlish M, Comerford DA, Phuoc LH, Phuong VH, O'Carroll RE. Understanding vaccine hesitancy in Vietnamese fish farmers. *Antibiotics* 2022; 11(7):878. doi: 10.3390/antibiotics11070878.
 11. Coyne L, Benigno C, Giang VN, Huong LQ, Kalprividh W, Padungtod P, Patrick I, Ngoc PT, Rushton J. Exploring the socioeconomic importance of antimicrobial use in the Small-Scale Pig Sector in Vietnam. *Antibiotics* 2020; 9(6):299. doi: 10.3390/antibiotics9060299.
 12. Duong HA, Phung TV, Nguyen TN, Phan Thi LA, Pham HV. Occurrence, distribution, and ecological risk assessment of antibiotics in selected urban lakes of Hanoi, Vietnam. *J Anal Methods Chem* 2021; 2021:6631797. doi: 10.1155/2021/6631797.
 13. El-Bahar HM, Ali NG, Aboyadak IM, Khalil SAES, Ibrahim MS. Virulence genes contributing to *Aeromonas hydrophila* pathogenicity in *Oreochromis niloticus*. *Int Microbiol* 2019; 22(4):479–490.
 14. Ender A, Goepfert N, Grimmeisen F, Goldscheider N. Evaluation of β -D-glucuronidase and particle-size distribution for microbiological water quality monitoring in Northern Vietnam. *Science of the Total Environment* 2017; 580:996–1006.

References

1. Beleneva IA, Zhukova NV, Lan Le Kh, Nguyen Tran DKh. Taksonomicheskij sostav mikroflory, assotsirovanny s kul'tiviruyemyimi mollyuskami *Crassostrea lugubris* i *Perna viridis* i s vodoy v lagune zaliva Nyachang, V'yetnam. *Mikrobiologiya* 2007; 76(2):253–262 (in Russian).

15. Harada K. Antibiotic residue in environmental water in Vietnam. *Yakugaku zasshi* 2018; 138(3):271–275.
16. Hoai TD, Trang TT, Van Tuyen N, Giang NTH, Van Van K. *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in channel catfish in Vietnam. *Aquaculture* 2019; 513:734425. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734425.
17. Hoa PT, Managaki S, Nakada N, Takada H, Shimizu A, Anh DH, Viet PH, Suzuki S. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. *Science of the Total Environment* 2011; 409(15):2894–2901. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.04.030.
18. Le TS, Nguyen TH, Vo HP, Doan VC, Nguyen L, Tran MT, Tran TT, Southgate PC, Kurtböke Dİ. Protective effects of bacteriophages against *Aeromonas hydrophila* causing *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) in striped catfish. *Antibiotics* 2018; 7(1):16. doi.org/10.3390/antibiotics7010016.
19. Mitchell MEV, Alders R, Unger F, Nguyen-Viet H, Le TTH, Toribio JA. The challenges of investigating antimicrobial resistance in Vietnam – what benefits does a One Health approach offer the animal and human health sectors? *BMC Public Health* 2020; 20(1):213. doi: 10.1186/s12889-020-8319-3.
20. Nakayama T, Tuyet Hoa TT, Harada K, Warisaya M, Asayama M, Hinenoya A, Lee JW, Phu TM, Ueda S, Sumimura Y, Hirata K, Phuong NT, Yamamoto Y. Water metagenomic analysis reveals low bacterial diversity and the presence of antimicrobial residues and resistance genes in a river containing wastewater from backyard aquacultures in the Mekong Delta, Vietnam. *Environ Pollut* 2017; 222:294–306.
21. Nguyen HT, Le QT, Garnier J, Janeau JL, Rochelle-Newall E. Seasonal variability of faecal indicator bacteria numbers and die-off rates in the Red River basin, North Vietnam. *Sci Rep* 2016; 6:21644. doi: 10.1038/srep21644.
22. Ninh DT, Le DV, Van KV, Huong Giang NT, Dang LT, Hoai TD. Prevalence, virulence gene distribution and alarming the multidrug resistance of *Aeromonas hydrophila* associated with disease outbreaks in freshwater aquaculture. *Antibiotics (Basel)* 2021; 10(5):532. doi: 10.3390/antibiotics10050532.
23. Pham-Duc P, Cook MA, Cong-Hong H, Nguyen-Thuy H, Padungtod P, Nguyen-Thi H, Dang-Xuan S. Knowledge, attitudes and practices of livestock and aquaculture producers regarding antimicrobial use and resistance in Vietnam. *PLoS One* 2019; 14(9):e0223115. doi: 10.1371/journal.pone.0223115.
24. Pham DK, Chu J, Do NT, Brose F, Degand G, Delahaut P, De Pauw E, Douny C, Nguyen KV, Vu TD, Scippo ML, Wertheim HF. Monitoring antibiotic use and residue in freshwater aquaculture for domestic use in Vietnam. *Ecohealth* 2015; 12(3):480–489.
25. Quang NX, Nguyen VS, Nguyen DT, Pham VL, Ngo TL. Biodiversity of littoral macroinvertebrates in the Mekong river. *Tạp chí KHOA HỌC ĐHS P TP HCM* 2013; 51:16–28.
26. Schar D, Klein EY, Laxminarayan R, Gilbert M, Van Boeckel TP. Global trends in antimicrobial use in aquaculture. *Sci Rep* 2020; 10:21878. doi: 10.1038/s41598-020-78849-3.
27. Ström GH, Björklund H, Barnes AC, Da CT, Nhi NHY, Lan TT, Magnusson U, Norman Haldén A, Boqvist S. Antibiotic use by small-scale farmers for freshwater aquaculture in the Upper Mekong Delta, Vietnam. *J Aquat Anim Health* 2019; 31(3):290–298.
28. Tong Thi AN, Noseda B, Samapundo S, Nguyen BL, Broekaert K, Rasschaert G, Heyndrickx M, Devlieghere F. Microbial ecology of Vietnamese Tra fish (*Pangasius hypophthalmus*) fillets during processing. *Int J Food Microbiol* 2013; 167(2):144–152. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.010.
29. Tran THT, Yanagawa H, Nguyen KT, Hara-Kudo Y, Taniguchi T, Hayashidani H. Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood and water environment in the Mekong Delta, Vietnam. *J Vet Med Sci* 2018; 80(11):1737–1742. doi: 10.1292/jvms.18-0241.
30. Van TT, Chin J, Chapman T, Tran LT, Coloe PJ. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *Int J Food Microbiol* 2008; 124. – No 3:217–223. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.029.

SANITARY-BACTERIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF WATER BODIES AND FOOD PRODUCTS FROM FISH OF THE SOCIALIST REPUBLIC OF VIETNAM

L.V. KATAEVA, T.F. STEPANOVA, A.A. VAKARINA, O.V. POSOYUZNYKH

Tyumen Research Institute of Regional Infectious Pathology of Rosпотребнадзор, Tyumen

The ecological pathways of antibiotic resistance have received increased attention in recent years. The aquatic environment acts as a reservoir or source of antibiotic-resistant bacteria, antimicrobial residues, and resistance gene complexes. In this regard, it is important to identify the role of contaminated water in the spread of bacterial resistance to antibiotics. There is still a large gap in understanding the genetic basis of antibiotic resistance and virulence of enteric bacteria ingested in humans and animals through food. Environmental studies are needed to develop more effective measures to prevent the high risk of transmission of infectious and parasitic foodborne diseases. At the same time, the issues of protection of habitats of rare and important species of hydrobionts are also important.

Keywords: water bodies, fish, aquaculture, bacteria, antibiotic resistance, sanitary microbiology, Socialist Republic of Vietnam (SRV).

Address:

Kataeva L.V., Ph.D.

Chief researcher, head of the bacteriological laboratory
of the Tyumen Research Institute of Regional Infectious
Pathology of Rospotrebnadzor

E-mail: KataevaLV@Tniikip.rospotrebnadzor.ru

Для цитирования:

Катаева Л.В., Степанова Т.Ф., Вакарина А.А., Посоюзных О.В. Санитарно-бактериологическая характеристика водных объектов и пищевой продукции из рыбы Социалистической Республики Вьетнам. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(2):100–110.

For citation:

Kataeva L.V., Stepanova T.F., Vakarina A.A., Posoyuznykh O.V. Sanitary-bacteriological characteristics of water bodies and food products from fish of the Socialist Republic of Vietnam. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(2):100–110 (in Russian).

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 30.06.2023
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 7,0. Тираж 1000 экз.

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