

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

В.С. Воробьев, Т.Н. Гаева, С.И. Матаев, А.А. Назаренко

Редакционный совет

В.Г. Дебабов (Москва), В.Т. Иванов (Москва), М.П. Кирпичников (Москва),
Э.И. Коломиец (Минск, Республика Беларусь), А.И. Мирошников (Москва),
Т.В. Овчинникова (Москва), В.О. Попов (Москва),
Э.М. Раманкулов (Астана, Республика Казахстан), А.Н. Решетилов (Пушино),
Э.К. Хуснутдинова (Уфа), Н.К. Янковский (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

2021, Vol. 17, No 1

**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

V.S. Vorobyev, T.N. Gaeva, S.I. Mataev, A.A. Nazarenko

Editorial council

V.G. Debabov (Moscow), V.T. Ivanov (Moscow), M.P. Kirpichnikov (Moscow),
E.I. Kolomiets (Minsk, Republic of Belarus), A.I. Miroshnikov (Moscow),
T.V. Ovchinnikova (Moscow), V.O. Popov (Moscow),
EM. Ramankulov (Astana, Republic of Kazakhstan), A.N. Reshetilov (Pushchino),
E.K. Khusnutdinova (Ufa), N.K. Yankovsky (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, Keramichesky 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, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Васильев* 5

Оригинальные статьи

Количественное определение натурального каучука в органах инулинсодержащих растений.

Б.Р. Кулуев, Ю.Р. Магасумова, А.Б. Якупова, Г.Р. Гумерова, Р.М. Таипова 6

Биохимические аспекты прорегенераторного действия 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния *n*-ацетил-6-аминогексаоната.

Е.В. Андрианова, Е.Н. Егорова, М.Б. Петрова, М.А. Пахомов 12

Оптимизация условий культивирования грибов *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D с целью увеличения выхода экзо- и эндоглюканаз.

Н.А. Атыкян, Е.А. Левина, С.А. Ибрагимова, С.В. Апарин, В.В. Ревин..... 17

Особенности контроля паровой стерилизации сборных изделий при производстве лекарственных средств.

А.Д. Белоусов, М.В. Антонычева, М.М. Чалбушев, К.И. Холматов, Н.И. Вахрушина, С.В. Астафьева 28

Применение селективной магнитной сорбции при индикации возбудителя туляремии методом MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа.

Е.А. Котенева, А.В. Калинин, Т.В. Жарникова, О.А. Гнусарева, И.В. Жарникова, А.С. Геогджаян, С.А. Курчева, О.И. Цыганкова, Е.С. Котенев, А.В. Абрамович..... 34

Метод MALDI-TOF масс-спектрометрии для изучения биопленок паразитических вибрионов.

О.С. Чемисова, М.В. Полеева 40

Обоснование возможности применения метаболитов *Trichoderma* spp. в составе ранозаживляющего средства для ветеринарии.

И.А. Гнеушева, И.Ю. Солохина, Н.Е. Павловская, Н.Ю. Агеева..... 48

Обзоры

Биотехнологические аспекты совершенствования методов выявления антител к вирусу бешенства животных.

В.А. Лобанова, В.И. Ключкина 62

Хроника 76

Страницы истории. Юбилейные и знаменательные даты 2021 года 78

Правила для авторов 79

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 5

Original articles

Quantitative determination of natural rubber in the organs of inulin-containing plants.

B.R. Kuluev, Yu.R. Magasumova, A.B. Yakupova, G.R. Gumerova, R.M. Taipova..... 6

Biochemical aspects of regenerative action 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridinium n-acetyl-6-aminohexanoate.

E.V. Andrianova, E.N. Egorova, M.B. Petrova, M.A. Pakhomov..... 12

Optimization of conditions for cultivation of mushrooms *Lentinus tigrinus* VKM F-3616 D with the purpose of increasing the output of exo- and endoglucanases.

N.A. Atykyan, E.A. Levina, S.A. Ibragimova, S.V. Aparin, V.V. Revin 17

Features of steam sterilization control for assembled products in manufacturing pharmaceuticals.

A.D. Belousov, M.V. Antonycheva, M.M. Chalbushev, K.I. Kholmatov, N.I. Vakhrushina, S.V. Astaf'eva..... 28

The use of selective magnetic sorption in the indication of the causative agent of tularemia by MALDI-TOF mass spectrometric analysis.

E.A. Koteneva, A.V. Kalinin, T.V. Zharnikova, O.A. Gnusareva, I.V. Zharnikova, A.S. Geogjayan, S.A. Kurcheva, O.I. Tsygankova, E.S. Kotenev, A.V. Abramovich 34

MALDI-TOF mass spectrometry method for study biofilms of parahemolytic vibrios.

O.S. Chemisova, M.V. Poleeva 40

Justification of the possibility of using *Trichoderma* spp. metabolites as part of a wound healing agent for veterinary medicine.

I.A. Gneusheva, I.Yu. Solokhina, N.E. Pavlovskaya, N.Yu. Ageeva 48

Reviews

Biotechnological aspects of improving detection methods antibodies to animal rabies virus.

V.A. Lobanova, V.I. Klyukina..... 62

The chronicle 76

Pages of history. Anniversary and significant dates 2021..... 78

Rules for authors 79

К читателям

Первый номер журнала за 2021 год содержит в основном работы оригинального характера. В исследовании Кулуева Б.Р. с соавторами из Уфы количественно определили содержание натурального каучука в органах ряда инулинсодержащих растений местного природного ареала и из опытных участков (были также использованы коллекции кок-сагыза из США и Республики Казахстан).

В экспериментальном исследовании Андриановой Е.В. (Тверской государственной медицинской университет) оценивали динамику заживления ожоговых ран кожи при местном лечении 2%-ной мазью с 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаонатом. Использование мази достоверно сокращает сроки регенерации термических ожогов. При этом снижается выраженность оксидативного стресса и протеолитической активности в тканях раневых дефектов.

Сотрудники Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева Атыкян А.Н. с коллегами подобрали оптимальные условия культивирования дереворазрушающих грибов *Lentinus tigrinus* с целью обеспечения максимального биосинтеза целлюлаз.

Коллективом сотрудников Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (Саратов) — Белоусов А.Д. и др. — разработаны способы контроля режима стерилизации в автоматическом стерилизаторе сложных сборных изделий, что послужило основой для валидации режима в промышленных регламентах производства лекарственных средств и медицинских изделий.

Исследователи из Ставропольского противочумного института Котенева Е.А. с соавторами применили способ селективной магнитной сорбции для диагностики возбудителя туляремии методом MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа. Предварительное селективное концентрирование позволило повысить чувствительность метода.

Чемисова О.С., Полеева М.В. (Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора) также использовали метод MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ion-ization Time-of-Flight) масс-спектрометрии, только с целью идентификации биопленок паразитических вибрионов и определения сравнительной характеристики белковых спектров «планктонных» и «биопленочных» форм на разных биотических субстратах.

В статье Гнеушевой И.А. и др. из Орловского государственного аграрного университета приведены результаты серии экспериментов по применению биологически активных пептидных метаболитов *Trichoderma atrovirideum* в составе ранозаживляющего линимента 3% с Na-карбоксиметилцеллюлозой, пантенолом и карбополом для животных.

В обзоре Лобановой В.А. и Ключиной В.И. (Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности) рассмотрены биотехнологические аспекты совершенствования методов выявления антител к вирусу бешенства животных.

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

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАТУРАЛЬНОГО КАУЧУКА В ОРГАНАХ ИНУЛИНСОДЕРЖАЩИХ РАСТЕНИЙ

Б.Р. КУЛУЕВ^{1,2*}, Ю.Р. МАГАСУМОВА², А.Б. ЯКУПОВА², Г.Р. ГУМЕРОВА¹, Р.М. ТАИПОВА²

¹Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение
ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук,

²Башкирский государственный университет, Уфа

Натуральный каучук и инулин являются ценными метаболитами, которыми наиболее богаты представители семейства астровых. Для повышения рентабельности производства представляется актуальным использование одного и того же растительного материала для получения как инулина, так и каучука. Целью нашей работы было определение содержания каучука в органах ряда инулинсодержащих растений. Наибольшее содержание натурального каучука из этой группы растений было обнаружено в листьях девясила высокого *Inula helenium* и стеблях топинамбура *Helianthus tuberosus*. Обсуждается также перспективность использования одуванчиков *Taraxacum kok-saghyz* и *Taraxacum hybernum* для одновременного получения из них каучука и инулина. Первый из этих одуванчиков содержит в корнях в среднем 4,5, а второй 2,5% каучука на сухую массу. Показано, что подсолнечник *Helianthus annuus* и одуванчик лекарственный *Taraxacum officinale* не представляют практической ценности как источники натурального каучука.

Ключевые слова: натуральный каучук, инулин, девясил высокий, топинамбур, цикорий обыкновенный, кок-сагыз, одуванчик осенний.

Введение

Натуральный каучук на сегодняшний день является важнейшим сырьем, прежде всего для шинной промышленности, где его доля в составе смеси для легковых покрышек составляет до 50%, для грузовых — до 85–100%, для авиационных шин — до 100% [5]. Важнейшим источником каучука является гевея бразильская *Hevea brasiliensis* из семейства *Euphorbiaceae*, способная произрастать только в тропической зоне. В связи с тем, что данное дерево все чаще поражается весьма опасным фитопатогеном *Microcyclus ulei*, становится актуальным поиск альтернативных растений-каучуконосов, в том числе способных произрастать и давать урожай в других климатических зонах. Для умеренного пояса таким признанным источником качественного каучука стал одуванчик кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz*) [9].

Большой интерес представляют также и другие виды одуванчиков, такие как одуванчик осенний (*Taraxacum hybernum*) и одуванчик короткорожковый (*Taraxacum brevicorniculatum*), в корнях которых также накапливается довольно много натурального каучука. Ранее нами был проведен поиск каучуконосов во флоре Республики Башкортостан и было показано, что список таких растений может быть значительно расширен, прежде всего, за счет представителей семейства астровых [5]. Однако основной проблемой остается нерентабельность производства натурального каучука из местного растительного сырья. Так, в отличие от гевеи бразильской, в случае использования одуванчиков и других представителей астровых должны быть задействованы большие промышленные мощности, что экономически может быть невыгодно. В то же время можно полагать, что эффективность такого производства может быть значительно увеличена при получении из одного и того же растительного сырья нескольких ценных веществ.

Многие растения семейства астровых характеризуются высоким содержанием такого метаболита, как инулин. Инулин — это полисахарид, являющийся для человека эффективным пребиотиком, так как хорошо растворяется в воде, не переваривается пищеварительными ферментами и поэтому может в полной мере быть использован кишечной микрофлорой. Инулин является раство-

© 2021 г. Кулуев Б.Р., Магасумова Ю.Р., Якупова А.Б., Гумерова Г.Р., Таипова Р.М.

* **Автор для переписки:**

Кулуев Булат Разяпович

заведующий лабораторией геномики растений Института биохимии и генетики УФИЦ РАН

E-mail: kuluev@bk.ru

римым пищевым волокном, которое при его употреблении внутрь может помочь снизить уровень липопротеинов низкой плотности («плохого» холестерина). Кроме того, инулин не влияет на уровень глюкозы в крови, поэтому может без опасения использоваться в рационе людей, больных диабетом [10]. Благодаря своим пребиотическим свойствам инулин проходит в неизменном состоянии до толстой кишки, где он способствует увеличению содержания полезных бифидобактерий и подавлению влияния вредных патогенных бактерий. Инулин и его производные также применяются в пищевой промышленности для улучшения питательных и функциональных свойств продуктов и используются в качестве заменителя жира, чтобы уменьшить калорийность пищи [11].

Таким образом, инулин является весьма ценным метаболитом, получаемым человеком из растений. Большинство инулинсодержащих растений является представителями двудольных, относящихся к семействам *Asteraceae*, у которых инулин заменяет собой крахмал. Основным источником инулина в европейских странах является цикорий обыкновенный (*Cichorium intybus*) — это вид многолетних трав семейства астровых. Содержание инулина в цикории составляет 12–30% на сырую массу в зависимости от сорта [7].

В России для промышленного получения инулина также используется топинамбур (*Helianthus tuberosus*). Содержание инулина в клубнях топинамбура в расчете на сырую массу составляет около 22% [8]. Многообещающим, но пока что не используемым для этих целей инулинсодержащим растением является девясил высокий (*Inula helenium*), также из семейства астровых [10]. Содержание инулина в корнях и корневищах девясила высокого составляет 50,2–53,1 и 36,9–39,1% на сухую массу, соответственно [8]. В последнее время проведено много исследований по одуванчику кок-сагызу, так как он является альтернативным источником для производства не только высококачественного каучука [2], но и инулина. Было выявлено, что инулин составляет основной углеводный запас в корнях кок-сагыза (около 16–20% от сырой массы корня) [14]. Недавние исследования показывают, что в корнях кок-сагыза содержится в среднем 18% инулина и 20% сахарозы [13]. Еще одним перспективным каучуконосным видом одуванчиков является *T. hybernum* — одуванчик осенний, также известный как крым-сагыз [3, 4]. В советской литературе имеются сведения не только о содержании высококачественного каучука в крым-сагызе, но и о накоплении в его корнях инулина, причем до 50% в расчете на сухую массу [1]. Способность к накоплению в корнях инулина является

характерным признаком рода *Taraxacum*. К примеру, близкий родственник кок-сагыза одуванчик короткорожковый *T. brevicorniculatum* в корнях содержит около 55,4% инулина на сухую массу [12].

Исходя из всех этих данных, представляется актуальным поиск растений, которые могли бы быть использованы в промышленных масштабах не только для получения инулина, но и натурального каучука. Это совмещенное производство могло бы способствовать увеличению рентабельности переработки данного растительного сырья. Целью настоящей работы была оценка количественного содержания каучука в наиболее известных инулинсодержащих растениях семейства астровых.

Материалы и методы

Сбор растительного материала осуществляли на территории Республики Башкортостан в летне-осенний сезон 2020 года. Места сбора указаны в таблице 1. У топинамбура, девясила высокого, цикория обыкновенного, подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus*) и одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale*) содержание каучука определяли как в корнях, так и в органах побега. Это связано с тем, что для этих видов растений в литературе имеется весьма скудная информация о содержании натурального каучука в отдельных органах. Кок-сагыз, одуванчик осенний и одуванчик короткорожковый не относятся к флоре Республики Башкортостан, поэтому они были выращены на опытном участке Института биохимии и генетики УФИЦ РАН рассадным методом.

У этих трех видов одуванчиков содержание каучука определяли только в корнях, так как имеется множество литературных данных о накоплении полиизопрена у этих видов именно в корнях. В работе были использованы две отдельные популяции кок-сагыза: KAZ08-023 из коллекции USDA (США), а также L2, предоставленная профессором Утеулиным К.Р. (Республика Казахстан). Семена буросемянной и розовосемянной форм одуванчика осеннего были предоставлены с.н.с. Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского Фатерьгой А.В. Собранный растительный материал предварительно высушивали в проветриваемом помещении при комнатной температуре в течение 15 дней для перевода всего каучука в коагулированное состояние. Для каждого вида растения использовали по пять экземпляров (n=5). Затем растительный материал размельчали ножницами и помещали в керамические ступки с пестиком, которые в дальнейшем замораживали в течение двух часов при температуре -70 °С. Затем растирали растительный материал и перено-

силы в предварительно взвешенные микропробирки на 1,5 мл (эппендорфы). Взвешивали массу растительного порошка и проводили процедуру выделения из него каучука с использованием полярных растворителей — дистиллированной воды и ацетона, а также неполярного растворителя гексана, основываясь на методах, описанных в литературе [13]. Всю процедуру выделения каучука проводили при комнатной температуре.

Модифицированный нами способ микровыделения каучука из растительного материала состоял в следующем. В растительный порошок добавляли 1 мл дистиллированной воды, перемешивали образцы в течение 30 минут, центрифугировали 12 тыс. об. мин. в течение 20 мин., надсадок удаляли. Процедуру водной экстракции проводили дважды для более полного удаления водорастворимых компонентов. Затем в образцы добавляли по 1 мл ацетона и перемешивали их в течение 3 часов (на встряхивателе «Ротамикс»), центрифугировали при 12 тыс. об. мин. в течение 20 мин., надсадок удаляли.

Таким образом, из растительного порошка убирали водный и ацетоновый экстракты, а каучук благодаря его переходу при сушке в коагулированное состояние и нерастворимость в полярных растворителях преимущественно

продолжал оставаться в этих образцах. Последующую экстракцию каучука проводили при помощи гексана, который добавляли в количестве 1 мл, образцы перемешивали 16 часов (на встряхивателе «Ротамикс»). Затем образцы центрифугировали при 12 тыс. об. мин. в течение 20 мин., надсадок переносили в новые заранее взвешенные микропробирки на 1,5 мл. Гексановый экстракт высушивали в термостате при +50 °С в течение 2,5 часов в вытяжном шкафу. Определяли массу высушенного экстракта. Результаты выражали в виде процента гексанового экстракта к сухой массе растительного материала.

Результаты и обсуждение

Согласно проведенному нами ранее анализу литературы, рекордсменами по содержанию инулина на территории нашей страны являются три вида растений: цикорий обыкновенный, топинамбур и девясил высокий, содержащие приблизительно 70, 50 и 53% этого метаболита на сухую массу корня [8]. Поэтому было решено определить содержание каучука, в первую очередь, у этих трех растений. У цикория наибольшее содержание каучука нами было обнаружено в листьях и стеблях (табл. 1).

Таблица 1

Средние значения массовой доли гексанового экстракта в органах анализированных инулинсодержащих растений к сухой массе растительной ткани

Вид растения	Местонахождение	Орган	Массовая доля гексанового экстракта на сухую массу ткани, %
Топинамбур <i>Helianthus tuberosus</i>	с. Иглино, Иглинский р-н, Республика Башкортостан	Листья	2,8±0,9
		Стебли	6,3±1,1
		Клубни	2,0±0,5
		Корни	2,0±0,8
Девясил высокий <i>Inula helenium</i>	с. Иглино, Иглинский р-н, Республика Башкортостан	Листья	6,6±1,2
		Корневище	5,1±0,6
		Корни	3,9±0,8
Цикорий обыкновенный <i>Cichorium intybus</i>	д. Меллисоновка, Бижбулякский р-н, Республика Башкортостан	Листья	5,0±1,2
		Стебли	4,5±1,2
		Корни	3,3±1,4
Подсолнечник однолетний <i>Helianthus annuus</i>	с. Иглино, Иглинский р-н, Республика Башкортостан	Листья	0,8±0,2
		Стебли	1,0±0,3
		Корни	0,5±0,1
Одуванчик лекарственный <i>Taraxacum officinale</i>	г. Уфа, Республика Башкортостан	Листья	2,0±0,4
		Корни	1,1±0,5
Одуванчик кок-сагыз <i>Taraxacum kok-saghyz</i> KAZ08-023	г. Уфа, Республика Башкортостан, опытный участок ИБГ УФИЦ РАН	Корни	4,5±1,2
Одуванчик кок-сагыз <i>Taraxacum kok-saghyz</i> L2	г. Уфа, Республика Башкортостан, опытный участок ИБГ УФИЦ РАН	Корни	4,5±1,5
Одуванчик короткорожковый <i>Taraxacum brevicorniculatum</i>	г. Уфа, Республика Башкортостан, опытный участок ИБГ УФИЦ РАН	Корни	2,1±0,8
Одуванчик осенний <i>Taraxacum hibernum</i> бурсемянный	г. Уфа, Республика Башкортостан, опытный участок ИБГ УФИЦ РАН	Корни	2,5±0,9
Одуванчик осенний <i>Taraxacum hibernum</i> розовосемянный	г. Уфа, Республика Башкортостан, опытный участок ИБГ УФИЦ РАН	Корни	2,5±0,5

Массовая доля гексанового экстракта в листьях цикория составила 5% на сухую массу, что не уступает корням такого известного каучуконоса, как кок-сагыз [5]. У топинамбура максимальное количество каучука было характерно для стеблей, тогда как в листьях, клубнях и корнях массовая доля гексанового экстракта была гораздо меньше (см. табл. 1). Процент содержания каучука в стеблях топинамбура составил в среднем 6,3%, что превышает показатели кок-сагыза, в корнях которого нами обнаруживалось около 4,5% гексанового экстракта на сухую массу (см. табл. 1). У девясила высокого также было найдено довольно значительное содержание каучукоподобных веществ: в его листьях содержание гексанового экстракта составило 6,6% (см. табл. 1). Довольно много каучука у девясила, судя по всему, имеется и в корневищах (5,1%). Еще одним видом растений, в корнях которого накапливается инулин, является подсолнечник, хотя он по этому показателю и существенно уступает родственному топинамбуру. Наши исследования показали, что все части подсолнечника содержат очень мало каучукоподобных веществ (см. табл. 1). Пожалуй, самым широко распространенным видом растений из изученных нами является одуванчик лекарственный, у которого в корнях накапливается около 40% инулина на сухую массу [8]. Данный вид одуванчиков не отличался высоким содержанием каучука ни в листьях, ни в корнях (см. табл. 1). Из трех изученных нами каучуконосных видов одуванчиков наибольшим содержанием инулина характеризуются одуванчик осенний и одуванчик короткорожковый, содержащие в корнях около 50% инулина на сухую массу [8]. Однако эти два вида одуванчиков в корнях содержат чуть больше 2% гексанового экстракта на сухую массу (см. табл. 1), то есть меньше, чем кок-сагыз. Необходимо отметить, что мы не установили разницы в содержании каучука у бурсемянной и розово-семянной форм одуванчика осеннего; в обеих формах оно составило в среднем 2,5%. Что характерно, у одуванчика короткорожкового в корнях накапливалось еще меньше каучука — 2,1% на сухую массу (см. табл. 1). Судя по литературным данным, кок-сагыз несколько уступает по содержанию инулина одуванчику осеннему [8]. Для обеих проанализированных популяций кок-сагыза нами было найдено в среднем 4,5% гексанового экстракта на сухую массу корня (см. табл. 1), что является наиболее высоким показателем для изученных нами каучуконосных одуванчиков.

Исходя из полученных нами данных, наибольший интерес представляет девясил высокий, который отличается большим содержанием инулина и каучука,

однако это растение является дикорастущим, что пока ограничивает широкое использование этого растения. Так, например, девясил, в отличие от культурных растений, характеризуется низкой всхожестью семян, недружностью всходов, неравномерным созреванием и относительно низкой продуктивностью корневищ. Поэтому перспективной представляется возможность domestikации девясила, тем более, что в его корневищах, кроме инулина и каучука, есть и другие ценные метаболиты [6]. Наряду с этим топинамбур и цикорий тоже могут рассматриваться в качестве источников натурального каучука. Однако полимерность и молекулярная масса полиизопрена у этих трех видов инулинсодержащих растений остается неизвестным. Как известно, применение в резиновой промышленности находит лишь каучук с молекулярной массой более 1 млн г/моль [5], в связи с чем каучук топинамбура, цикория и девясила должен быть дополнительно проверен на эти и другие качественные показатели. По-другому обстоит дело с кок-сагызом, его каучук уже давно признан высококачественным и применимым в резиновой промышленности. Учитывая, что корни этого одуванчика также содержат немало инулина, данный вид растений может стать рентабельным источником обоих растительных метаболитов. Одуванчик осенний также продуцирует высококачественный каучук и довольно много инулина. Поэтому указанный вид также должен быть включен в список перспективных источников инулина и каучука. В то же время одуванчик лекарственный и подсолнечник содержат крайне мало каучука и не так много инулина, поэтому не являются перспективными для промышленного производства рассматриваемых растительных метаболитов.

Заключение

Итак, согласно проведенному нами экспериментальному исследованию, наиболее перспективными для одновременного получения инулина и натурального каучука являются девясил высокий, а также одуванчики кок-сагыз и крым-сагыз. Однако каучук девясила нуждается в дополнительных исследованиях на ряд качественных показателей, таких как полимерность, молекулярная масса и др.

Работа выполнена в рамках госзадания АААА-А19-119021190011-0 при поддержке гранта Президента Республики Башкортостан (проект ГР).

Литература

1. Аксельрод Д.М. Культура крымсагыза / В кн. Каучук и каучуконосы. Под ред. М.М. Ильина. — 1953. — С. 237–315.
2. Гаршин М.В., Картуха А.И., Кулуев Б.Р. Кок-сагыз: особенности культивирования, перспективы возделывания и внедрения в современное производство // Биомика. — 2016. — № 4. — С. 323–333.
3. Кулуев Б.Р., Картуха А.И., Князев А.В., Фатерыга А.В., Чемерис А.В. Опыт выращивания *Taraxacum hybernum* (Asteraceae) // Растительные ресурсы. — 2017. — № 4. — С. 543–554.
4. Кулуев Б.Р., Фатерыга А.В., Кулуев А.Р., Михайлова Е.В., Чемерис А.В. Молекулярно-генетическое исследование одуванчика осеннего (*Taraxacum hybernum* Steven) с использованием SSR-, RAPD- и ISSR-маркеров // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2018. — Т. 22. — С. 102–107.
5. Кулуев Б.Р., Мулдашев А.А., Минченков Н.Д., Чемерис А.В. Поиск потенциальных каучуконов в флоре Республики Башкортостан // Растительные ресурсы. — 2019. — Т. 55. — № 3. — С. 317–333.
6. Матасова С.А., Митина Н.А., Рыжова Г.Л., Жуганов Д.О., Дычко К.А. Получение сухого экстракта из корней девясила высокого и изучение его химического состава // Химия растительного сырья. — 1999. — № 2. — С. 119–123.
7. Полянина Т.Ю., Вьютнова О.М., Новикова И.А. Хозяйственное значение, химический состав и целебные свойства цикория // Известия ФНЦО. — 2019. — № 2. — С. 94–97.
8. Сербаяева Э.Р., Якупова А.Б., Магасумова Ю.Р., Фархутдинова К.А., Ахметова Г.Р., Кулуев Б.Р. Инулин: природные источники, особенности метаболизма в растениях и практическое применение // Биомика. — 2020. — Т. 12. — С. 57–79.
9. Хайруллин Р.Э., Власова Ю.С., Янов В.В. Перспективы использования альтернативных видов растительного сырья для производства натурального каучука // Вест. Каз. техн. ун-та. — 2014. — Т. 17. — С. 205–206.
10. Barkhatova T.V., Nazarenko M.N., Kozhukhova M.A., Khripko I.A. Obtaining and identification of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) tubers // Foods and Raw Materials. — 2015. — Vol. 3. — No. 2. — P. 13–22.
11. Kathy R. Inulin and oligofructose: what are they? // The Journal of Nutrition. — 1999. — Vol. 129. — P. 1402–1406.
12. Post J., van Deenen N., Fricke J., Kowalski N., Wurbs D., Schaller H., Eisenreich W., Huber C., Twyman R.M., Prüfer D., Gronover C.S. Laticifer-specific cis-prenyltransferase silencing affects the rubber, triterpene, and inulin content of *Taraxacum brevicorniculatum* // Plant Physiol. — 2012. — Vol. 158. — P. 1406–1417.
13. Ramirez-Cadavid D.A., Cornish K., Michel F.C. Jr. *Taraxacum kok-saghyz* (TK): compositional analysis of a feedstock for natural rubber and other bioproducts // Industrial Crops and Products. — 2017. — Vol. 107. — P. 624–640.
14. Ulmann M. Wertvolle Kautschukpflanzen des gemäßigten Klimas dargestellt aufgrund sowjetischer Forschungsarbeiten. — Berlin (Germany): Akademie-Verlag GmbH, 1951. — 562 p.

References

1. Aksel'rod DM. Kul'tura krymsagya. V kn Kauchuk i kauchukonosy. Pod red. M.M. Il'ina 1953: 237–315 (in Russian).
2. Garshin MV, Kartukha AI, Kuluyev BR. Kok-sagyz: osobennosti kul'tivirovaniya, perspektivy vzdelyvaniya i vnedreniya v sovremennoye proizvodstvo. Biomika 2016; 4:323–333 (in Russian).
3. Kuluyev BR, Kartukha AI, Knyazev AV, Fateryga AV, Chemeris AV. Opyt vyrashchivaniya *Taraxacum hybernum* (Asteraceae). Rastitel'nyye resursy 2017; 4:543–554 (in Russian).
4. Kuluyev BR, Fateryga AV, Kuluyev AR, Mikhaylova YeV, Chemeris AV. Molekulyarno-geneticheskoye issledovaniye oduvanchika osennogo (*Taraxacum hybernum* Steven) s ispol'zovaniyem SSR-, RAPD- i ISSR-markero. Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii 2018; 22:102–107 (in Russian).
5. Kuluyev BR, Muldashev AA, Minchenkov ND, Chemeris AV. Poisk potentsial'nykh kauchukonosov vo flore Respubliki Bashkortostan. Rastitel'nyye resursy 2019; 55(3):317–333 (in Russian).
6. Matasova SA, Mitina NA, Ryzhova GL, Zhuganov DO, Dychko KA. Polucheniye sukhogo ekstrakta iz korney devyasila vysokogo i izucheniye yego khimicheskogo sostava. Khimiya rastitel'nogo syr'ya 1999; 2:119–123 (in Russian).
7. Polyaniina TYu, V'yutnova OM, Novikova IA. Khozyaystvennoye znachenie, khimicheskii sostav i tselebnyye svoystva tsikoriya. Izvestiya FNTSO 2019; 2:94–97 (in Russian).
8. Serbayeva ER, Yakupova AB, Magasumova YuR, Farkhutdinova KA, Akhmetova GR, Kuluyev BR. Inulin: prirodnnye istochniki, osobennosti metabolizma v rasteniyakh i prakticheskoye primeneniye. Biomika 2020; 12:57–79 (in Russian).
9. Khayrullin RZ, Vlasova YuS, Yanov VV. Perspektivy ispol'zovaniya al'ternativnykh vidov rastitel'nogo syr'ya dlya proizvodstva natural'nogo kauchuka. Vest Kaz tekhn un-ta 2014; 17:205–206 (in Russian).
10. Barkhatova TV, Nazarenko MN, Kozhukhova MA, Khripko IA. Obtaining and identification of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) tubers. Foods and Raw Materials 2015; 3(2):13–22.

11. Kathy R. Inulin and oligofructose: what are they? *The Journal of Nutrition* 1999; 129:1402–1406.
12. Post J, van Deenen N, Fricke J, Kowalski N, Wurbs D, Schaller H, Eisenreich W, Huber C, Twyman RM, Prüfer D, Gronover CS. Laticifer-specific cis-prenyltransferase silencing affects the rubber, triterpene, and inulin content of *Taraxacum brevicorniculatum*. *Plant Physiol* 2012; 158:1406–1417.
13. Ramirez-Cadavid DA, Cornish K, Michel FC Jr. *Taraxacum kok-saghyz* (TK): compositional analysis of a feedstock for natural rubber and other bioproducts. *Industrial Crops and Products* 2017; 107:624–640.
14. Ulmann M. Wertvolle Kautschukpflanzen des gemäßigten Klimas dargestellt aufgrund sowjetischer Forschungsarbeiten. Berlin (Germany): Akademie-Verlag GmbH, 1951: 562.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF NATURAL RUBBER IN THE ORGANS OF INULIN-CONTAINING PLANTS

B.R. KULUEV^{1,2}, Yu.R. MAGASUMOVA², A.B. YAKUPOVA², G.R. GUMEROVA¹, R.M. TAIPOVA²

¹*Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal Research Centre of RAS,*

²*Bashkir State University, Ufa*

Natural rubber and inulin are valuable metabolites, which are the most abundant in the *Asteraceae* family. To increase the profitability of production, it seems relevant to use the same plant material for the production of both inulin and natural rubber. The purpose of our work was to determine the content of rubber in the organs of a number of inulin-containing plants. The highest content of natural rubber from this group of plants was found in the leaves of *Inula helenium* and stems of *Helianthus tuberosus*. The prospects of using dandelions *Taraxacum kok-saghyz* and *Taraxacum hybernum* for the simultaneous production of rubber and inulin from them are also discussed. The first of these dandelions contains an average of 4.5%, and the second 2.5% natural rubber on a dry mass of roots. It has been shown that the *Helianthus annuus* and the *Taraxacum officinale* are not of practical value as sources of natural rubber.

Keywords: natural rubber, inulin, *Inula helenium*, *Helianthus tuberosus*, *Cichorium intybus*, *Taraxacum kok-saghyz*, *Taraxacum hybernum*.

Address:

Kuluev B.R.

Head of the Plant Genomics Laboratory of the Institute

Biochemistry and Genetics,

Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences

E-mail: kuluev@bk.ru

Для цитирования:

Кулуев Б.Р., Магасумова Ю.Р., Якупова А.Б., Гумерова Г.Р., Таипова Р.М. Количественное определение натурального каучука в органах инулинсодержащих растений. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(1):6–11.

For citation:

Kuluev B.R., Magasumova Yu.R., Yakupova A.B., Gumerova G.R., Taipova R.M. Quantitative determination of natural rubber in the organs of inulin-containing plants. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(1):6–11 (in Russian).

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОРЕГЕНЕРАТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ 2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ГИДРОКСИПИРИДИНИЯ N-АЦЕТИЛ- 6-АМИНОГЕКСАОНАТА

Е.В. АНДРИАНОВА, Е.Н. ЕГОРОВА*, М.Б. ПЕТРОВА, М.А. ПАХОМОВ

ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Тверь

В эксперименте на крысах оценивалась динамика заживления ожоговых ран кожи при местном лечении 2%-ной мазью с 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаоната. Выявлено, что использование мази достоверно сокращает сроки регенерации термических ожогов и происходит на фоне снижения выраженности оксидативного стресса и протеолитической (металлопротеиназы 9 типа — ММП-9) активности в тканях раневых дефектов. Установлена корреляция средней степени в отношении площадей ожоговых дефектов и протеолитической активности ММП-9 в тканях ран, а также в отношении протеолитической активности ММП-9 и выраженности оксидативного стресса в гомогенатах регенерирующих тканей на 7- и 14-е сутки эксперимента, то есть в фазы воспаления и пролиферации раневого процесса.

Ключевые слова: 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаонат, матриксные металлопротеиназы, тканевые ингибиторы металлопротеиназ, ожоговая рана, регенерация.

Введение

Морфологические и биохимические процессы, составляющие патогенез раневого процесса в коже после повреждающего воздействия, остаются в поле зрения отечественных и зарубежных исследователей [1, 3, 7]. Ожидаемый прогресс в данной области связан с поиском индукторов регенераторного процесса. Перспективными в аспекте стимуляции процессов заживления термических ожогов кожи являются препараты N-ацетил-6-аминогексановой кислоты (ацексамовой кислоты) и ее производные [2, 6], не обладающие токсическими свойствами [4]. При этом представляет интерес исследование динамики показателей сопутствующих биохимических процессов, в частности, металлопротеазной активности и выраженности оксидативного стресса в регенерирующих тканях, их корреляции между собой и площадью раневых дефектов для оценки ранозаживляющих свойств 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаоната (2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ).

Цель настоящей работы: в эксперименте на крысах оценить динамику заживления ожоговых ран кожи при местном лечении 2% мазью с 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаоната, изучить выраженность оксидативного стресса и активность матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в регенерирующих тканях на этапах раневого процесса.

Материалы и методы

Эксперименты по моделированию ожогов выполнены на 45 беспородных самках крыс массой 180–200 г в соответствии с правилами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Directive 2010/63/EU). До нанесения дефекта животным выстригали шерсть и подшерсток в межлопаточной области и под общим ингаляционным наркозом [5] выполняли термический ожог III степени площадью 225 мм² стальным трафаретом с экспозицией 8 секунд (t=240 °C). Крысы были разделены на три группы по 15 особей в каждой. Контрольную группу № 1 составили животные с термическим ожогом без лечения, крысам контрольной группы № 2 на область ожога наносили мазевую основу (полиэтиленгликоль). Третья группа (опытная) получала местную терапию 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ (АО «ВНЦ БАВ», г. Старая Купавна) в виде 2% мази на основе полиэтиленгликоля. Нанесение веществ проводили со вторых суток экспе-

© 2021 г. Андрианова Е.В., Егорова Е.Н., Петрова М.Б., Пахомов М.А.

* Автор для переписки:

Егорова Елена Николаевна

д.м.н., доцент, заведующий кафедрой биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России

E-mail: enegor@mail.ru

римента до отторжения струпа ежедневно, однократно, после измерения площади ожога. Динамику заживления поражения оценивали по сокращению его площади, а также рассчитывали скорость убывания площади дефекта за сутки по формуле: $\Delta S = ((225 - S_n) / 225) \times 100\%$, где 225 — исходная площадь ожога (мм²), S_n — площадь раны на текущий день измерения (мм²).

На 7-, 14- и 21-е сутки животных выводили из эксперимента, осуществляли биопсию регенерирующих тканей для морфологических и биохимических исследований. Гистологические микропрепараты получали с парафиновых блоков, изготовленных по общепринятому протоколу, окрашивали гематоксилином с эозином и использовали для общей оценки состояния исследуемых тканей.

Для биохимических исследований из биоптатов регенерирующих тканей стандартизированной массы (без струпа и подкожной жировой клетчатки) изготавливали гомогенаты, используя гомогенизатор «Minilys» производства «Bertin Instruments» (Франция), в изотоническом растворе натрия хлорида в соотношении 1:10 (масса:объем). Индекс оксидативного стресса (ИОС) в супернатантах гомогенатов рассчитывали как отношение общей оксидантной активности к общей антиоксидантной активности, определенных фотометрическим методом с помощью тест-систем «Total Oxidative status/capacity PerOx (TOS) Kit» и «Total Antioxidative status/capacity PerOx (TAS) Kit» производства «Immundiagnostik AG» (Германия). В супернатантах гомогенатов методом иммуноферментного анализа проводили количественное определение металлопротеиназы 9-го типа (ММП-9) и тканевого ингибитора металлопротеиназ первого типа (ТИМП-1), используя тест-системы «Rat Total MMP-9» производства «R&D Systems, Inc.» (США) и «Rat TIMP-1» производства «Cloud-Clone Corp.» (США) соответственно. Для оценки результатов эксперимента использовали отношение ММП-9/ТИМП-1, поскольку именно соотношение фермента и его ингибитора характеризует частично протеолитическую активность в пораженных тканях [8] и влияет на процесс репарации. Статистический анализ полученных данных выполняли с помощью программы IBM® SPSS® Statistics 23.0 «IBM Corporation» (USA). Количественные данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего. Для оценки статистической значимости разности средних в двух группах применяли критерии Стьюдента и Манна — Уитни, в трех группах — Крускала — Уоллиса. Различия между показателями в группах считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки зависимости между показателями использовали ранговый коэффициент корреляции Спирмена (R_s).

Результаты и обсуждение

Планиметрическая оценка площади термических поражений кожи на 7-е сутки эксперимента показала, что у животных опытной группы абсолютные значения этого параметра были достоверно ниже в сравнении с обеими группами контроля (табл. 1). При этом скорость сокращения площади струпа составила в опытной группе 21,7% против 4,4% и 7,1% в контрольных № 1 и № 2 соответственно. Гистологические исследования выявили у крыс этой группы отсутствие тенденции к распространению воспалительного инфильтрата в окружающие ткани, что характеризует процесс очищения раневого поля как более качественный и интенсивный.

Биохимические показатели в гомогенатах тканей из области дефекта в опытной группе крыс достоверно были ниже, чем в обеих контрольных группах, между которыми статистически значимых различий не выявлено. Так, в опытной группе животных ИОС был меньше, чем в контрольных группах соответственно на 44,6 и 42,5%, а ММП-9/ТИМП-1 — на 31,4 и 25,8%.

Таблица 1

Площадь дефектов и биохимические показатели в гомогенатах в динамике регенерации термического ожога кожи крыс

Группы животных	Показатели, (M±m)		
	Площадь ожога, мм ²	ИОС, ед.	ММП-9/ТИМП-1, ед.
7 суток			
Контрольная № 1	215,5±3,74	7,09±0,80	70,3±4,83
Контрольная № 2	209,8±2,37	6,84±0,94	65,0±5,28
Опытная	176,0±12,62*	3,93±0,57*	48,2±1,84*
14 суток			
Контрольная № 1	126,1±3,50	5,96±0,83	78,9±3,24
Контрольная № 2	120,6±2,37	4,72±0,52	72,5±2,20
Опытная	48,5±6,71*#	2,75±0,26*#	35,7±1,05*#
21-е сутки			
Контрольная № 1	43,3±5,49#	0,92±0,04#	49,0±0,84#
Контрольная № 2	38,1±5,01#	0,86±0,07#	46,8±1,96#
Опытная	0 (рубец)*#	0,66±0,05*#	22,5±0,70*#

Примечание: * — различие статистически значимо ($p < 0,05$) между показателями у животных опытной группы и группами контроля № 1 и № 2, # — различие статистически значимо ($p < 0,05$) между показателями у животных группы в сравнении с предыдущим сроком эксперимента

На 14-е сутки эксперимента площади термических дефектов кожи продолжали сокращаться с разной скоростью у животных сравниваемых групп. Так, у крыс, получавших местную терапию ожогов мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, она составила 78,2%, в то время как в контрольных группах № 1 и № 2 соответственно 44,0 и 46,6%. Микроскопически раневой дефект у крыс этой группы под струпом был выполнен широким пластом грануляционной ткани, строение которой указывало на активно протекающую стадию пролиферации репаративного процесса.

Динамика изученных биохимических показателей в гомогенатах грануляционной ткани группы животных, получавших местное лечение 2% мазью, содержащей 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, статистически значимо отличалась от таковой в обеих контрольных группах, как и предыдущий срок наблюдения. Так, ИОС был ниже, чем в контрольных группах на 53,9 и 41,7%, а ММП-9/ТИМП-1 — на 54,8 и 50,6% соответственно. Значения изученных биохимических показателей и их соотношений в обеих контрольных группах достоверно не различались.

На 21-е сутки эксперимента зона бывшего ожога у крыс опытной группы представлена соединительнотканым рубцом, отторжение фрагментов струпа произошло на $17 \pm 1,3$ день наблюдения, что свидетельствует о полном завершении регенераторных процессов под влиянием 2% мази с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ. В то время как в контрольных группах № 1 и 2 регенерация еще не завершена и площадь струпа составляла соответственно 19,1 и 16,8% от исходной. Полученные результаты свидетельствуют о прорегенераторных свойствах 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, примененного местно в виде 2% мази.

В этот же срок наблюдения в гомогенатах новообразованных тканей животных опытной группы ИОС был меньше, чем в контрольных группах, на 28,3 и 23,3%, а ММП-9/ТИМП-1 — на 54,1 и 51,9% соответственно. В обеих контрольных группах значения биохимических показателей достоверно не различались между собой.

Таким образом, напряженность оксидативного стресса и протеолитическая активность желатиназы ММП-9 в гомогенатах тканей в процессе регенерации снижались, причем в группе животных, получавших обработку ожоговых ран мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, достоверно быстрее по сравнению с контрольными группами.

Сравнение полученных результатов между собой в динамике экспериментального моделирования термического ожога кожи в разные сроки раневого процесса выявило, что каждый из изученных показателей, включая

площадь раневых дефектов, во всех группах животных на 21-е сутки эксперимента достоверно был ниже, чем на 14-е сутки. Однако только у крыс опытной группы значения всех показателей на 14-е сутки наблюдения были статистически значимо ниже, чем на 7-е сутки.

Следовательно, результаты эксперимента позволяют сделать вывод о том, что 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ обладает прорегенераторным эффектом, поскольку достоверно ускоряет заживление термических ожогов кожи. Изучение динамики металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов, а также общей оксидантной и антиоксидантной активности в гомогенатах тканей из области раневых дефектов продемонстрировало, что репарация термических ожогов при региональном лечебном воздействии мазью, содержащей 2% 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, протекает на фоне снижения протеолитической активности и свободно-радикальных процессов в тканях. Для установления наличия взаимосвязи между изучаемыми процессами нами был проведен корреляционный анализ зависимости площадей раневых дефектов — от показателей оксидативного стресса (S и ИОС), площадей раневых дефектов от протеолитической активности ММП-9 (S и ММП-9/ТИМП-1), а также протеолитической активности ММП-9 — от активности оксидативного стресса (ММП-9/ТИМП-1 и ИОС) на 7-, 14- и 21-е сутки эксперимента.

Корреляционный анализ зависимости ИОС и ММП-9/ТИМП-1 в гомогенатах тканей из области ожогов позволил установить корреляцию средней степени между ними только у крыс опытной группы на 7- и 14-е сутки эксперимента — 0,56 и 0,64 ($p < 0,05$) соответственно. В указанные сроки исследования у животных, получавших аппликации мази с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, наблюдалась достоверная корреляция ($R_s = 0,66$ и $R_s = 0,53$ соответственно) между площадями термических дефектов и протеолитической активностью ММП-9 (S и ММП-9/ТИМП-1). Статистически значимая корреляция в отношении S и ИОС в гомогенатах тканей во всех группах животных и во все сроки наблюдения не обнаружена.

Учитывая патогенез раневого процесса и причинно-следственные связи между его факторами можно предложить следующую логическую цепочку взаимосвязи изученных в данном эксперименте параметров. Термическое воздействие вызывает повреждение эпидермиса, дермы и подкожной клетчатки, в которых развивается местное воспаление и формируется раневой дефект. Постоянным типовым патологическим процессом в фазу воспаления (7-е сутки) является оксидативный стресс, в отноше-

нии которого и протеолитической активности ММР-9 в гомогенатах тканей обнаружена корреляция средней степени. В свою очередь, между протеолитической активностью ММР-9 в гомогенатах тканей и площадями раневых дефектов также выявлена корреляция средней степени, что может свидетельствовать о том, что площадь заживающего ожога зависит, в том числе, от активности ММР-9. Подобная ситуация (влияние ОС и протеолитической активности ММР-9) наблюдается и на стадии пролиферации (14-е сутки эксперимента), но исчезает на последней стадии раневого процесса — эпителизации. Предложенная схема влияния ОС на продукцию ММР-9 и, в свою очередь, воздействие последней на процесс заживления ран кожи, представляются логичными, поскольку именно на стадиях воспаления и преимущественно пролиферации раневого процесса происходят процессы морфогенеза тканей кожи.

Заключение

Проведенные исследования показали, что местное лечебное воздействие термических ожогов кожи крыс мазью, содержащей 2% 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаоната, достоверно сокращает сроки их заживления и происходит на фоне снижения выраженности оксидативного стресса и протеолитической (ММП-9) активности в тканях раневых дефектов. В группе животных, получавших мазевые аппликации с 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаонатом, выявлена корреляция средней степени в отношении площадей ожоговых дефектов и протеолитической активности ММР-9 в тканях ран, а также в отношении протеолитической активности ММР-9 и выраженности оксидативного стресса в гомогенатах регенерирующих тканей на 7- и 14-е сутки эксперимента, то есть в фазы воспаления и пролиферации раневого процесса.

Литература

1. Алексеева Н.Т., Никитюк Д.Б., Глухов А.А. Репаративная регенерация в зоне раневого дефекта на фоне применения светотерапии // *Морфология*. — 2013. — № 4. — С. 60.
2. Андрианова Е.В., Егорова Е.Н., Петрова М.Б., Петровская М.А., Скачилова С.Я. Динамика металлопротеиназной активности как показатель прорегенераторных свойств нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты при лечении ожогов // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. — 2020. — № 10. — С. 46–52.

3. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Крылов А.А., Исаев А.А., Плакса И.Л., Деев Р.В. Регенеративные технологии в лечении синдрома диабетической стопы // *Гены и клетки*. — 2017. — Т. 12. — № 1. — С. 15–26.
4. Попов Н.С. Фармакологические эффекты нового аминокислотного производного тиadiaзола: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. — Тверь, 2019. — 23 с.
5. Препараты для анестезии у мелких домашних животных // URL: <http://www.veterinarka.ru/for-vet/preparaty-dlya-anestezii-u-melkih-domashnih-zhivotnyh.html> (Дата обращения 20.01.2021).
6. Скачилова С.Я., Ермакова Г.А., Блинова Е.В., Блинов Д.С., Пахомов Д.В., Кильмяшкина М.Ф., Шимановский Д.Н., Петрова М.Б., Егорова Е.Н., Андрианова Е.В., Петровская М.А., Желтухин Н.К., Коротоножкин А.В. Мазь для лечения ожогов 1–3 степени // Патент на изобретение № 2731175 зарегистрирован в Государственном реестре изобретений РФ 31.08.2020 г.
7. Bondarenko L.B., Gorchakova N.O., Golembiovskaya O.I., Galkin O.Y. Promising new fixed combination for the treatment of diseases of the hepatobiliary system: Substantiation of pharmacotherapeutic properties and pharmaceutical quality profile // *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. — 2018. — Vol. 9. — No. 1. — P. 23–40.
8. Tian Y.-Q., Ning X.-H., Yin D.-Y., Zhang Y.-N., Zhao Zh.-H., Wang Y., Li Y.-L., Li X. Expression of MMP-9 and TIMP-1 in rat models of pressure ulcer and their significance // *Int. J. Clin. Exp. Med.* — 2019. — Vol. 12. — No. 6. — P. 7209–7216.

References

1. Alekseyeva NT, Nikityuk DB, Glukhov AA. Reparativnaya regeneratsiya v zone ranevogo defekta na fone primeneniya svetoterapii. *Morfologiya* 2013; 4:60. (in Russian).
2. Andrianova YeV, Yegorova YeN, Petrova MB, Petrovskaya MA, Skachilova SYa. Dinamika metalloproteinaznoy aktivnosti kak pokazatel' proregeneratornykh svoystv novogo proizvodnogo N-atsetil-6-aminogeksanovoy kisloty pri lechenii ozhogov. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii* 2020; 10:46–52 (in Russian).
3. Kalinin RYe, Suchkov IA, Mzhavanadze ND, Krylov AA, Isayev AA, Plaksa IL, Deyev RV. Regenerativnyye tekhnologii v lechenii sindroma diabeticheskoy stopy. *Geny i kletki* 2017; 12(1):15–26 (in Russian).
4. Popov NS. Farmakologicheskiye efekty novogo aminokislotnogo proizvodnogo tiadiazola: avtoref dis ... kand farm nauk. Tver' 2019: 23 (in Russian).
5. Preparaty dlya anestezii u melkikh domashnikh zhivotnykh // URL: <http://www.veterinarka.ru/for-vet/preparaty-dlya-anestezii-u-melkih-domashnih-zhivotnyh.html> (Data obrashcheniya 20.01.2021) (in Russian).

6. Skachilova SYa, Yermakova GA, Blinova YeV, Blinov DS, Pakhomov DV, Kil'myashkina MF, Shimanovskiy DN, Petrova MB, Yegorova YeN, Andrianova YeV, Petrovskaya MA, Zheltukhin NK, Korotonozhkin AV. Maz' dlya lecheniya ozhogov 1–3 stepeni. Patent na izobreteniyе № 2731175 zaregistrovan v Gosudarstvennom reyestre izobreteniy RF 31.08.2020 g. (in Russian).
7. Bondarenko LB, Gorchakova NO, Golembiovska OI, Galkin OY. Promising new fixed combination for the treatment of diseases of the hepatobiliar system: Substantiation of pharmacotherapeutic properties and pharmaceutical quality profile. *Regulatory Mechanisms in Biosystems* 2018; 9(1):23–40.
8. Tian Y-Q, Ning X-H, Yin D-Y, Zhang Y-N, Zhao Zh-H, Wang Y, Li Y-L, Li X. Expression of MMP-9 and TIMP-1 in rat models of pressure ulcer and their significance. *Int J Clin Exp Med* 2019; 12(6):7209–7216.

BIOCHEMICAL ASPECTS OF REGENERATIVE ACTION 2-ETHYL-6-METHYL-3-HYDROXYPYRIDINIUM N-ACETYL-6-AMINOHEXAONATE

E.V. ANDRIANOVA, E.N. EGOROVA, M.B. PETROVA, M.A. PAKHOMOV

Tver State Medical University, Tver

Dynamics of the healing of skin burn wounds was assessed during local treatment with 2% ointment with 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridinium N-acetyl-6-aminohexaonate in an experiment on rats. It was found that the use of the ointment significantly reduces the regeneration time of thermal burns and occurs at a decrease in the severity of oxidative stress and proteolytic (type 9 metalloproteinase (MMP-9)) activity in the tissues of wound defects. The correlation of average level was established between the areas of burn defects and proteolytic activity of MMP-9 in wound tissues, as well as between the proteolytic activity of MMP-9 and the severity of oxidative stress in homogenates of regenerating tissues on days 7 and 14 of the experiment, that is, in phases of inflammation and proliferation of the wound process.

Keywords: 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridinium N-acetyl-6-aminohexaonate, matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, burn wound, regeneration.

Address:

Egorova E.N., M.D.

Associate Professor, Head of the Department of Biochemistry with a course of clinical laboratory diagnostics of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education of the Tver State Medical University of the Ministry of Health of Russia
E-mail: enegor@mail.ru

Для цитирования:

Е.В. Андрианова, Е.Н. Егорова, М.Б. Петрова, М.А. Пахомов. Биохимические аспекты прорегенераторного действия 2-этил-6-метил-3-гидроксиридиния n-ацетил-6-аминогексаоната. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(1):12–16.

For citation:

E.V. Andrianova, E.N. Egorova, M.B. Petrova, M.A. Pakhomov. Biochemical aspects of regenerative action 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridinium n-acetyl-6-aminohexaonate. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2021; 17(1):12–16 (in Russian).

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБОВ *LENTINUS TIGRINUS* ВКМ F-3616 D С ЦЕЛЬЮ УВЕЛИЧЕНИЯ ВЫХОДА ЭКЗО- И ЭНДОГЛЮКАНАЗ

Н.А. АТЫКЯН^{1*}, Е.А. ЛЕВИНА¹, С.А. ИБРАГИМОВА¹, С.В. АПАРИН², В.В. РЕВИН¹

¹ ФГБОУ ВО НИ Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, факультет биотехнологии и биологии, кафедра биотехнологии, биоинженерии и биохимии;

² ФГБОУ ВО НИ Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, факультет биотехнологии и биологии, кафедра ботаники, физиологии и экологии растений, Саранск

Подобраны оптимальные условия культивирования, позволяющие обеспечить максимальный биосинтез целлюлаз дереворазрушающим грибом *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D: начальное значение рН питательной среды — 5,0; температура культивирования — 28 °С; продолжительность культивирования — 7 суток. Целлюлазы выделены и очищены до гомогенного состояния, что дало возможность повысить удельную активность исследуемого целлюлазного комплекса в 10,9 раза по сравнению с исходной. Анализ свойств очищенных ферментов показал, что исследуемый гриб продуцирует несколько типов целлюлаз — экзоглобукиназы (целлобиогидролазы) с молекулярными массами 43 и 52 кДа и эндоглобукиназы с молекулярными массами 25, 48 и 50 кДа.

Ключевые слова: целлюлазы, эндоцеллюлазы, целлобиазы, *Lentinus tigrinus*, оптимизация условий культивирования, выделение и очистка ферментов.

Введение

Растительная биомасса в зависимости от вида растений содержит 31–40% целлюлозы, 35–48% гемицеллюлозы и 15–25% лигнина. Использование биотрансформации лигноцеллюлозы для производства различных продуктов (биотоплива, кормов, сахаров и т.д.) в настоящее время является быстро расширяющейся областью исследований, а эффективное использование ксилозы и глюкозы является одним из ключевых аспектов превращения этой биотрансформации в промышленную технологию [16, 18, 26].

Основным продуктом гидролиза целлюлозы служат глюкоза и другие гексозы, в то время как гемицеллюлозные гидролизаты — это главным образом ксилоза и другие пентасахара [9, 22].

Гидролиз целлюлозы осуществляется целлюлазами — ферментами класса гидролаз, катализирующих гидролиз β -1,4-гликозидных связей в молекуле целлюлозы с образованием набора олигосахаридов различной степени по-

лимеризации вплоть до мономера — глюкозы [28, 31–33]. По типу действия на субстраты целлюлазы делят на эндо-1,4- β -глобукиназы (КФ 3.2.1.4), экзо-целлобиогидролазы (КФ 3.2.1.91), экзо-1,4- β -глобукозидазы (КФ 3.2.1.74), β -глобукозидазы (целлобиазы) (КФ 3.2.1.21) [12].

Гидролиз целлюлозы осуществляется целлюлазными полиферментными системами [5].

В природе целлюлазы синтезируются грибами, бактериями или актиномицетами [7, 13]. Наиболее же эффективными продуцентами целлюлаз выступают грибы бурой гнили, относящиеся к различным видам: *Aspergillus amstelodamy*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Penicillium notatum*, *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma virida*, *Trichoderma koningii* и многие другие [2, 14, 17, 20, 21, 29]. Грибы белой гнили (лигнолитики) изучены в этом плане хуже.

Известно, что и у грибов бурой и у грибов белой гнили ферментативный гидролиз целлюлозы и сопутствующих ей полисахаридов (β -глобуканов, ксиланов) осуществляется комплексом различных ферментов, различающихся по субстратной специфичности, которые получили название целлюлазного комплекса [6].

Цель нашей работы заключалась в оптимизации условий культивирования гриба *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D с целью получения экзо- и эндоглобукиназ.

© 2021 г. Атыкян Н.А., Левина Е.А., Ибрагимова С.А., Апарин С.В., Ревин В.В.

* **Автор для переписки:**

Атыкян Нелли Альбертовна

к.б.н., доцент, факультет биотехнологии и биологии, кафедра биотехнологии, биоинженерии и биохимии ФГБОУ ВО НИ МГУ им. Н.П. Огарева, Саранск

E-mail: kistig2@yandex.ru

Материалы и методы

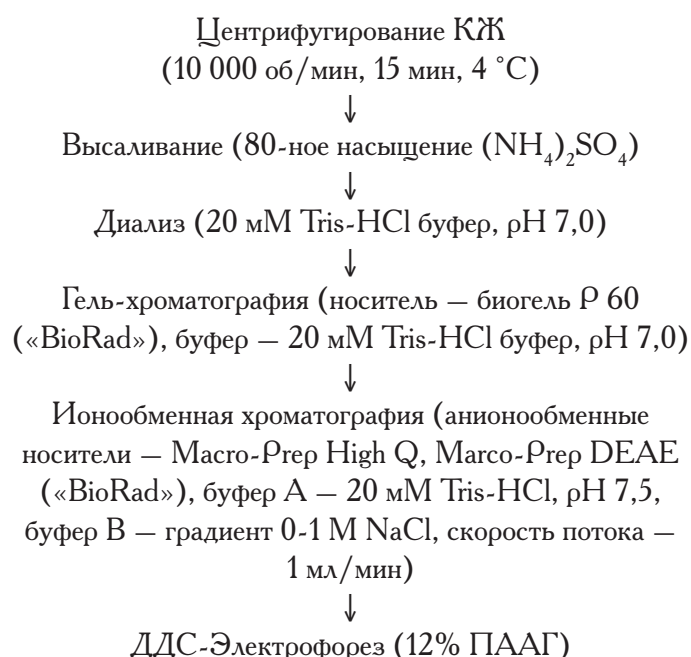
Объекты исследования. В работе был использован лигнолитический гриб *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D, выделенный на кафедре биотехнологии, биоинженерии и биохимии ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева» и депонированный в ВКМ.

Культивирование микроорганизмов. Культуру гриба поддерживали на агаризованной среде Чапека — Докса при 4 °С после выращивания их в течение 7 суток при 28 °С.

Для глубинного культивирования использовали жидкую среду Мэнделя — Вэбера [24] следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1,4; KH_2PO_4 — 2,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,3; CaCl_2 — 0,3; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,005; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,0014; $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,0016; CoCl_2 — 0,002; карбоксиметилцеллюлоза — 10; твин 80 — 2 мл, рН — 6,5.

Глубинное культивирование осуществляли в конических колбах Эрленмейера объемом 250 мл со 100 мл среды, в шейкере-инкубаторе ES-20/60 («Biosan», Латвия) со скоростью вращения 200 об/мин при 28 °С в течение 7 суток. В опытные колбы вносили 3-суточный инокулят в количестве 10% к объему питательной среды.

Выделение ферментов. Для выделения белков были использованы стадии грубого фракционирования посредством центрифугирования, высаливания сульфатом аммония (80%-ное насыщение) и диализа против соответствующего буфера с последующим тонким фракционированием с помощью гель-фильтрации, ионообменной хроматографии, электрофореза. Схема выделения представлена ниже:



Метод определения концентрации белка. Содержание белка в культуральной жидкости (КЖ), а также в ферментных препаратах определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта БСА [23]. Для спектрофотометрических измерений использовали спектрофотометр UV mini-1240 фирмы «Shimadzu» (Япония).

Методы определения активности ферментов. Активность целлюлаз по фильтровальной бумаге (АФБ) определяли стандартным методом при 50 °С и рН 5,0, используя хроматографическую бумагу № 1 производства «Whatman» (Англия) [6].

Авицеллазную активность определяли по начальной скорости образования ВС (динитросалициловым методом) при гидролизе МКЦ по методике: в пробирку вместимостью 10 см³ вносили 100 мг МКЦ, приливали 1 см³ 0,1 М ацетатного буфера с рН 5,0 и 1 см³ фильтрата культуральной жидкости. Смесь инкубировали 60 мин при 50 °С. Полученные гидролизаты фильтровали и определяли в них содержание редуцирующих сахаров методом с применением 3,5-динитросалициловой кислоты [25]. За единицу авицеллазной (экзоглоканазной) активности принимали такое количество фермента, которое в принятых стандартных условиях (рН — 5,0, температура инкубации — 50 °С, продолжительность гидролиза — 1 ч) катализирует гидролиз микрокристаллической целлюлозы с образованием 1 микромоля редуцирующих сахаров.

Эндоглоканазную активность определяли по начальной скорости образования ВС при использовании в качестве субстрата 1%-ного раствора Na-КМЦ в 0,1 М ацетатном буферном растворе с рН 5,0. В пробирку объемом 10 см³ помещали 1 мл 1%-ного раствора Na-КМЦ в 0,1 М ацетатном буферном растворе с рН 5,0 и 1 см³ исследуемого фильтрата культуральной жидкости, перемешивали и инкубировали при 50 °С в течение 10 мин. Полученные гидролизаты фильтровали и определяли в них содержание редуцирующих сахаров методом с применением 3,5-динитросалициловой кислоты [25]. За единицу КМЦ-азной (эндоглоканазной) активности принимали такое количество фермента, которое в принятых стандартных условиях (рН — 5,0, температура инкубации — 50 °С, продолжительность гидролиза — 10 минут) катализирует гидролиз целлюлозы с образованием 1 микромоля редуцирующих сахаров.

Результаты и обсуждение

Оптимизация условий культивирования. Ранее нами были подобраны оптимальные концентрации и источники азота и углерода [4]. Поэтому перед нами стояла задача оптимизации условий культивирования.

Как известно, рН является одним из наиболее важных факторов, влияющих как на рост самих грибов, так и на способность их к биосинтезу соответствующих ферментов [3, 10]. В связи с этим были проведены исследования по изучению влияния исходного значения рН питательной среды для гриба *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D. Для этого культивирование продуцентов осуществляли в диапазоне

значений рН от 4,0 до 7,0 с шагом 0,5 при 28 °С в течение 11 суток в динамических условиях в шейкер-инкубаторе (200 об./мин). В процессе культивирования проводили измерение авицелазной и КМЦ-азной активностей в культуральной жидкости каждые сутки с момента начала культивирования и по полученным значениям судили о динамике накопления целлюлаз в среде (рис. 1).

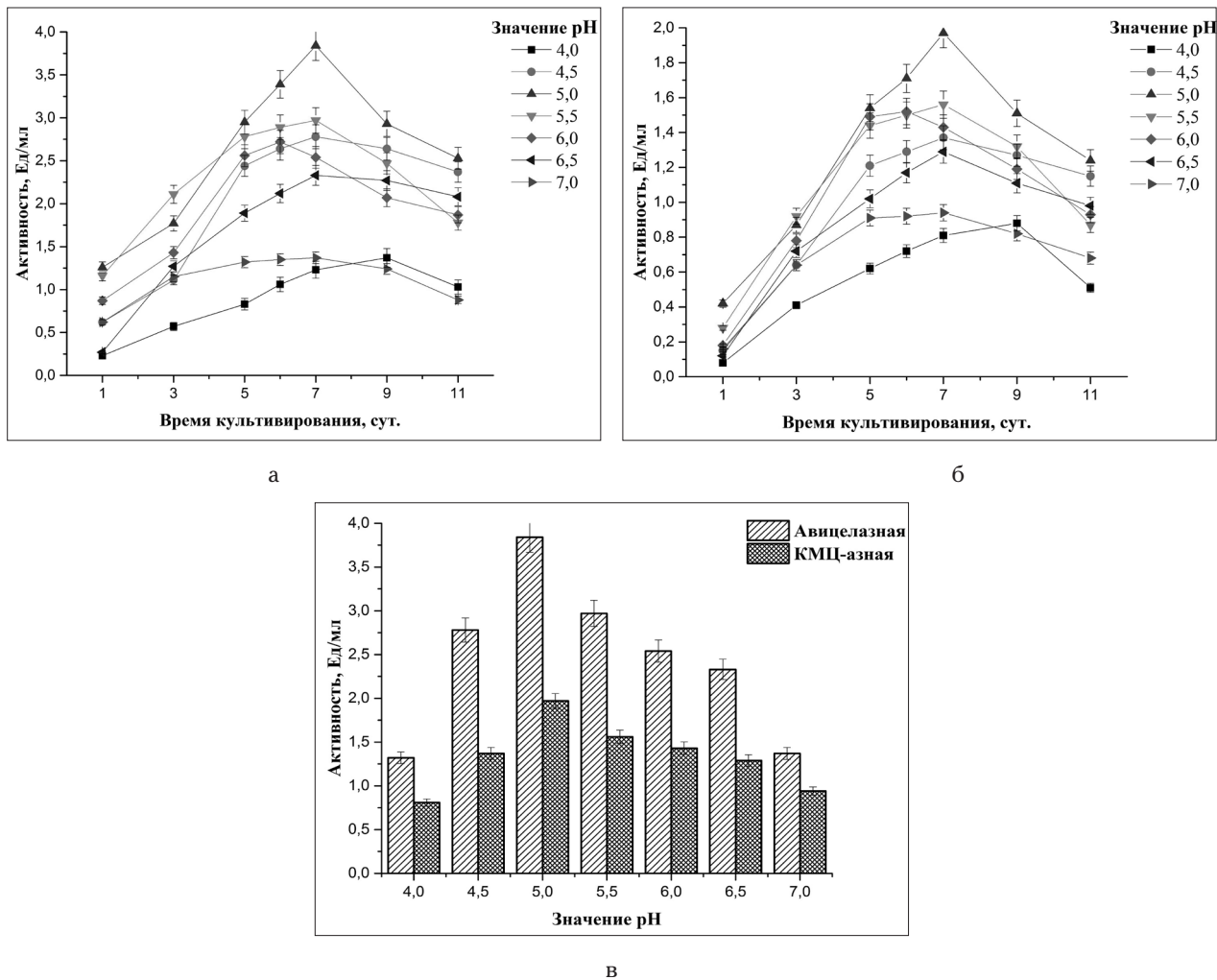


Рис. 1. Влияние начального рН ферментационной среды на биосинтез целлюлаз грибом *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D: а) динамика авицелазной активности, б) динамика КМЦ-азной активности, в) динамика целлюлазной активности на 7-е сутки культивирования

Как видно из данных, приведенных на рисунке 1, уровень биосинтеза целлюлаз постепенно возрастает с увеличением значения исходного рН ферментационной среды и достигает своего максимума при рН 5,0–5,5.

Температура ферментационной среды является также одним из важнейших факторов, оказывает влияние на скорость клеточных реакций, характер метаболизма и потребности в питательных веществах. Описаны случаи, когда температура, обеспечивающая оптимальный рост, соответствует температуре, которая

обеспечивает максимальный биосинтез интересующих ферментов [27].

Именно поэтому в ходе дальнейшей работы нами были проведены исследования по влиянию температуры культивирования в диапазоне от 24 °С до 38 °С с шагом 2 °С на биосинтез целлюлаз гриба *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D.

Из полученных данных (рис. 2) видно, что максимальный биосинтез целлюлаз данным продуцентом наблюдается при культивировании при температуре 28 °С.

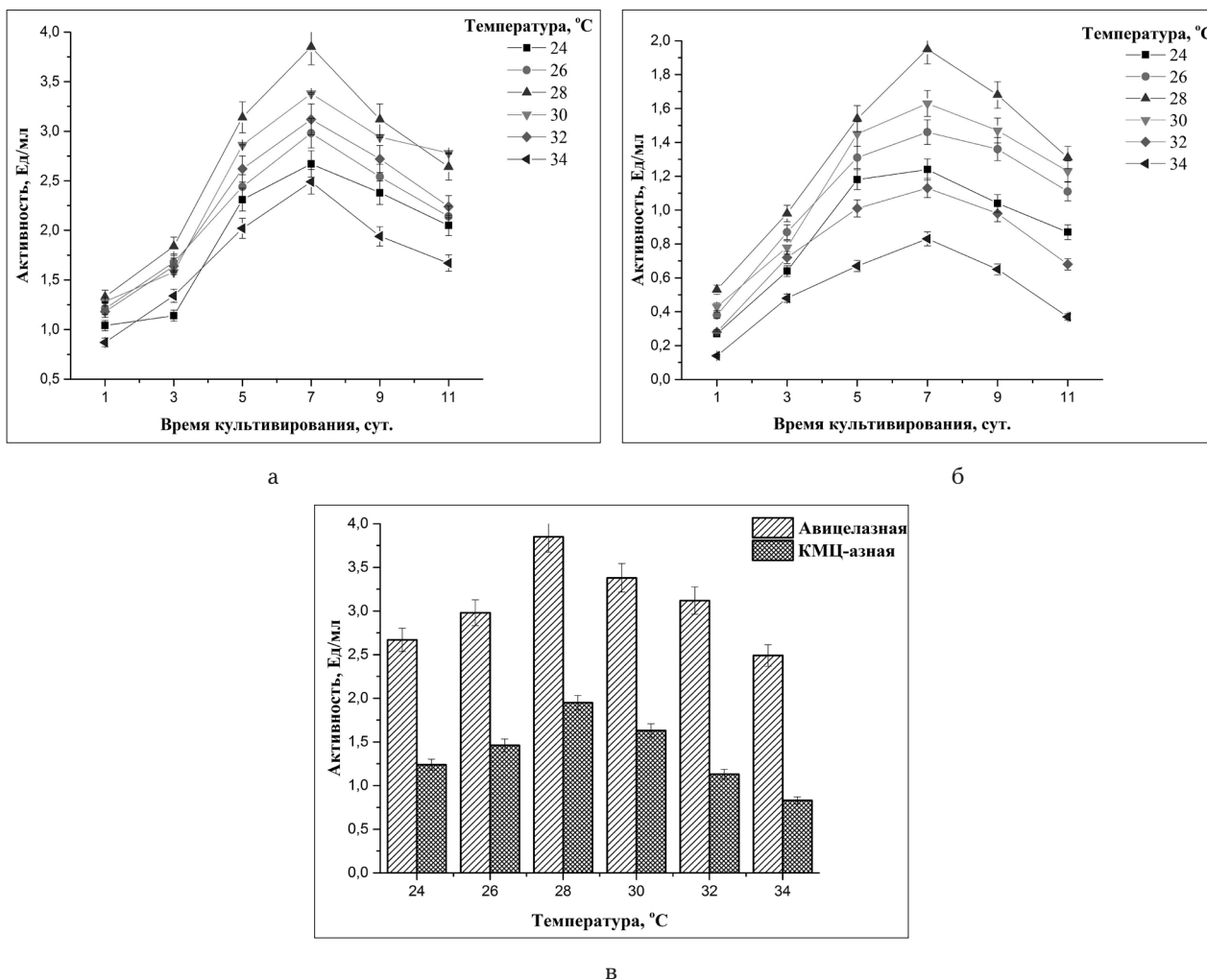


Рис. 2. Влияние температуры на биосинтез целлюлаз грибом *Lentinus tigrinus* VKM F-3616 D: а) динамика авицелазной активности, б) динамика КМЦ-азной активности, в) динамика целлюлазной активности на 7-е сутки культивирования

Также было проведено исследование по определению оптимального времени культивирования для биосинтеза целлюлаз исследуемыми грибами. Для этого культивирование продуцентов проводили в динамических условиях при установленных ранее оптимальных значениях рН и температуры, то есть рН 5,0 и 28 °С. За динамикой накопления целлюлаз следили по ферментативной активности в культуральной жидкости в течение 10 суток, с отбором проб каждые сутки.

Результаты выполненного эксперимента приведены на рисунке 3. Как следует из представленных данных, для биосинтеза целлюлаз грибом *Lentinus tigrinus* VKM F-3616 D оптимальная продолжительность культивирования составляет 7 суток, так как наблюдается максимальная целлюлазная активность: авицелазная ($3,96 \pm 0,14$ Ед/мл) и КМЦ-азная ($2,02 \pm 0,08$ Ед/мл).

Следовательно, на основании проведенных исследований нами были установлены оптимальные условия культивирования, позволяющие обеспечить максимальный биосинтез целлюлаз: начальное значение рН питательной среды — 5,0; температура культивиро-

вания — 28 °С; продолжительность культивирования — 7 суток.

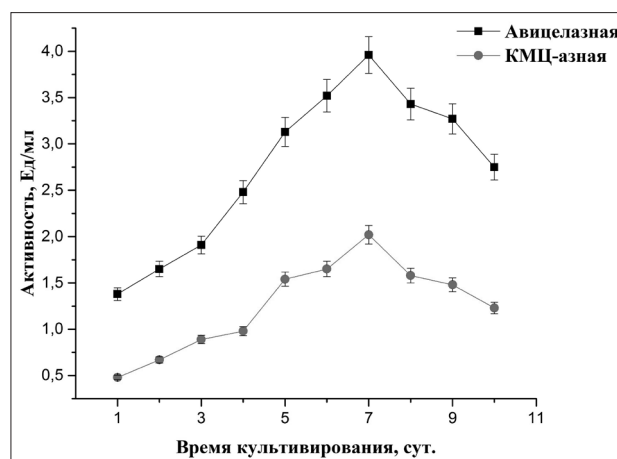


Рис. 3. Влияние продолжительности культивирования на биосинтез целлюлаз *Lentinus tigrinus* VKM F-3616 D

Выделение, очистка и идентификация целлюлаз. Из культуральной жидкости, полученной по

оптимизированному варианту, выделяли целлюлазные ферменты. На первом этапе получали грубый ферментный препарат гриба *L. tigrinus*. Для этого отделяли культуру гриба путем центрифугирования (10 000 об./

мин, 10 мин), из супернатанта выделяли белки методом высаливания (80%-ное насыщение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), далее проводили диализ против соответствующего буфера (табл. 1) с контролем по сульфату бария.

Таблица 1

Выделение и очистка целлюлаз гриба *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D

Этап выделения и очистки	Объем образца, мл	Концентрация белка, мг/мл	Активность, Ед/мл	Удельная активность, Ед/мг белка	Степень очистки
Центрифугирование КЖ	100	0,78±0,02	3,96±0,18	5,08±0,25	1,0
Высаливание сульфатом аммония (80% насыщение)	10	3,82±0,15	22,23±0,12	5,82±0,29	1,1
Диализ против буфера	15	3,66±0,11	24,19±0,08	6,61±0,19	1,3
Гель-хроматография	24	1,42±0,14	14,61±0,02	10,28±0,16	2,0
Ионообменная хроматография:					
Фракция I	8	0,48±0,11	25,87±2,15	53,76±2,21	10,9
Фракция II	4	0,37±0,05	24,43±1,34	66,93±3,42	
Фракция III	10	0,27±0,07	12,44±1,41	45,74±2,75	

Как видно из полученных данных (см. табл. 1), проведение данных стадий фракционирования позволило получить грубый ферментный препарат гриба *L. tigrinus* ВКМ F-3616 D, обладающий удельной целлюлазной активностью, равной 6,61±0,19 Ед/мг белка. Тем самым удалось повысить удельную активность ферментного препарата по сравнению с исходной в культуральной жидкости в 1,3 раза.

На следующем этапе для фракционирования исследуемого нами ферментного комплекса применяли метод гель-хроматографии с целью удаления излишков соли после осуществления процесса высаливания и содержащихся в культуральной жидкости окрашенных вторичных метаболитов.

Фракционирование и выделение ферментов осуществляли с использованием хроматографической системы NGS с коллектором фракций BioFrac и программным обеспечением фирмы «Bio-Rad» (США). Хроматографическая система состояла из автоматического контроллера процесса, насосов, ультрафиолетового и кондуктометрического проточных детекторов и коллектора фракций. Поскольку из литературных данных [10] известно, что в среднем молекулярная масса целлюлаз составляет 20–100 кДа, поэтому в качестве носителя для хроматографии использовали биогель P-60 фирмы «Bio-Rad» (США), выполненный на основе полиакриламида, с областью разделения белков по относительной молекулярной массе 30–70 кДа. Использовали колонку диаметром 1 см,

высота слоя сорбента (биогель P-60 фирмы «Bio-Rad», США) составляла 80 см. Элюентом служил 20 мМ Tris-HCl буфер (рН 7,0), объем наносимого образца — 10 мл (36,62±2,12 мг белка), скорость потока — 0,5 мл/мин, объем фракций — 0,5 мл [15, 19, 30].

В процессе выделения за элюцией белка с колонки следили спектрофотометрически по поглощению на длине волны 280 нм. Полученные в ходе хроматографии фракции были отобраны и проанализированы на наличие целлюлазной активности (рис. 4).

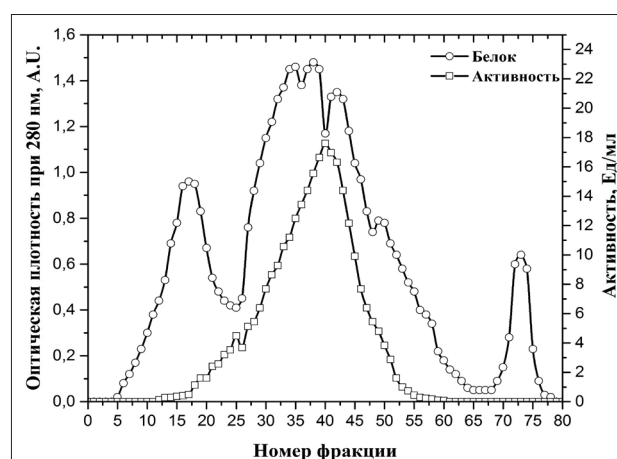


Рис. 4. Гель-хроматография грубого ферментного препарата целлюлаз гриба *L. tigrinus* ВКМ F-3616 D (носитель — биогель P-60, буфер — 20 мМ Tris-HCl, рН 7,0; скорость потока — 0,5 мл/мин; объем фракций — 0,5 мл)

Как видно из представленных данных (см. рис. 4), в результате проведения гель-хроматографии грубого ферментного препарата гриба *L. tigrinus* целлюлазная активность была обнаружена во фракциях с 12 по 60. Отобранные таким образом фракции, обладающие исследуемой ферментативной активностью, были объединены и проанализированы на содержание белка, была в них определена и целлюлазная активность (см. табл. 1).

Для определения компонентного состава полученного после гель-хроматографии ферментного препарата был проведен SDS-электрофорез в денатурирующих условиях в 12%-ном полиакриламидном геле. Полученные результаты приведены на рисунке 5.

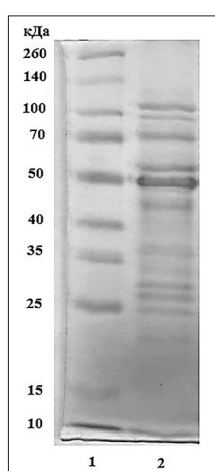


Рис. 5. SDS-электрофорез (12% ПААГ) ферментного препарата гриба *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D после гель-хроматографии: 1 — маркер; 2 — ферментный препарат

Из рисунка 5 видно, что в составе полученного после гель-хроматографии ферментного препарата гриба *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D было обнаружено тринадцать белковых компонентов, с различной молекулярной массой: 20; 25; 28; 30; 32; 37; 43; 48; 50; 55; 74; 96 и 110 кДа. То есть, помимо исследуемых нами целлюлаз, в составе ферментного комплекса гриба *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D присутствует большое количество побочных белковых фракций, что, в свою очередь, требует применения более тонких методов фракционирования.

Итак, можно сделать общий вывод о том, что использование процесса гель-хроматографии является эффективным этапом очистки. Данный метод позволяет не только удалить из ферментного препарата соли и другие метаболиты, содержащиеся в культуральной жидкости, но и фракционировать белки, проявляющие исследуемую нами целлюлазную активность. Несмотря

на то, что в результате гель-хроматографии концентрация белка в препаратах значительно снизилась (см. табл. 1), что обусловлено разбавлением раствора буфером в ходе процесса выделения, указанный метод позволил повысить удельную активность препарата *L. tigrinus* с $6,61 \pm 0,19$ до $10,28 \pm 0,16$ Ед/мг белка, что в 1,5 раза больше по сравнению с предыдущим этапом очистки.

Дальнейший этап выделения и очистки заключался в проведении ионообменной хроматографии. Для этого использовали колонку с ионообменным носителем — Macro-Prep DEAE («BioRad», США). Объем колонки составлял 1 мл, объем наносимого образца — 10 мл ($14,22 \pm 2,41$ мг белка). Элюентом служил 20 мМ Tris-HCl буфер (рН 7,5), скорость потока — 1,0 мл/мин, объем фракций — 2 мл. Исследуемые белки элюировали в градиенте 0–0,5 М NaCl в течение 10 минут [6]. За элюцией белка с колонки следили спектрофотометрически по поглощению на длине волны 280 нм. Полученные фракции были отобраны и проанализированы на наличие целлюлазной активности (рис. 6).

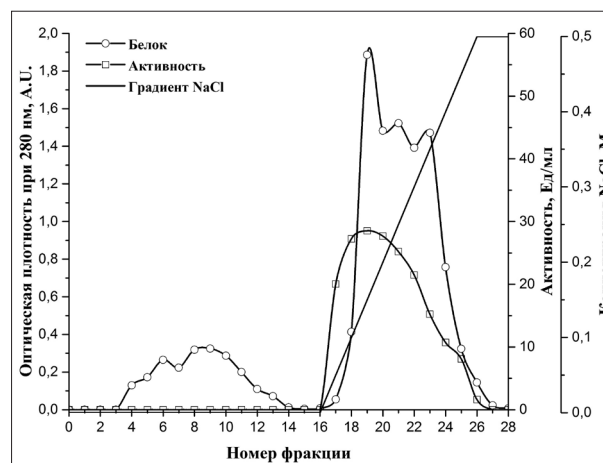


Рис. 6. Ионообменная хроматография целлюлазного комплекса гриба *L. tigrinus* ВКМ F-3616 D на колонке Macro-Prep DEAE (скорость потока — 1 мл/мин, объем фракций — 2 мл)

Из полученных данных (см. рис. 6) видно, что при элюировании в градиенте NaCl выходило три пика — фракция I (с 17 по 20), фракция II (с 21 по 22) и фракция III (с 23 по 27), обладающие целлюлазной активностью (см. табл. 1).

Для определения компонентного состава полученных после ионообменной хроматографии фракций был проведен SDS-электрофорез в денатурирующих условиях в 12%-ном полиакриламидном геле. Полученные результаты приведены на рисунке 7.

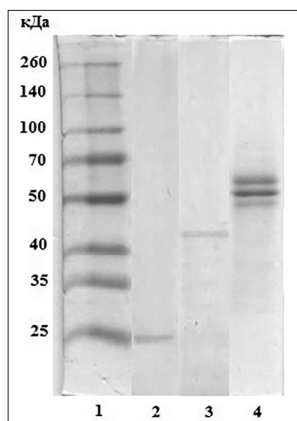


Рис. 7. SDS-электрофорез (12% ПААГ) целлюлазного комплекса гриба *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D после ионообменной хроматографии на колонке Macro-Pper DEAE: 1 — маркер; 2 — фракция I; 3 — фракция II; 4 — фракция III

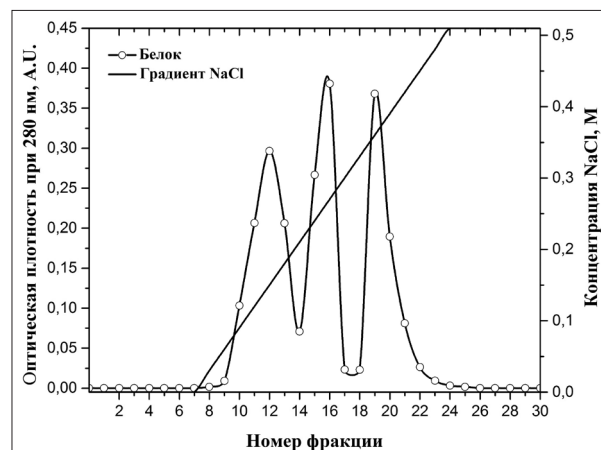


Рис. 8. Ионообменная хроматография фракции III на колонке Macro-Pper High Q: скорость потока — 1 мл/мин, объем фракций — 0,5 мл

Из рисунка 7 видно, что в составе фракции I и II содержатся гомогенные белки молекулярной массой 25 и 43 кДа, соответственно. Что касается фракции III, из приведенной электрофореграммы видно, что в ее составе присутствуют три белковых компонента с различной молекулярной массой: 48, 50 и 52 кДа. То есть, необходимо провести еще один этап фракционирования с целью выделения белков, содержащихся в III фракции, в гомогенном виде.

С этой целью фракцию III подвергли ионообменной хроматографии на колонке Macro-Pper High Q («BioRad», США). Объем колонки составлял 1 мл, объем наносимого образца — 10 мл ($2,72 \pm 0,11$ мг белка). Элюентом служил 20 мМ Tris-HCl буфер (рН 7,5), скорость потока — 1,0 мл/мин, объем фракций — 0,5 мл. Исследуемые белки элюировали в градиенте 0–0,5 М NaCl в течение 10 минут. За элюцией белка с колонки следили спектрофотометрически по поглощению на длине волны 280 нм (рис. 8).

Из представленной хроматограммы (см. рис. 8) видно, что в ходе разделения фракции III посредством ионообменной хроматографии на колонке Macro-Pper High Q («BioRad», США) вышли три пика, соответствующие идентифицированным ранее гомогенным белкам с молекулярной массой 48, 50 и 52 кДа. Для подтверждения данных предположений фракции, соответствующие указанным пикам, были объединены в три: фракция III/1 (с 9 по 14), фракция III/2 (с 15 по 17) и фракция III/3 (с 18 по 26) и подвергнуты SDS-электрофорезу в денатурирующих условиях в 12%-ном полиакриламидном геле. Полученные результаты приведены на рисунке 9.

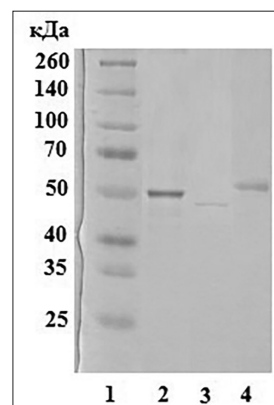


Рис. 9. SDS-электрофорез (12% ПААГ) фракции III ферментного препарата гриба *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D после ионообменной хроматографии на колонке Macro-Pper High Q: 1 — маркер; 2 — фракция III/1; 3 — фракция III/2; 4 — фракция III/3

Из рисунка 9 видно, что в составе исследуемых фракций — фракция III/1, фракция III/2, фракция III/3 — содержатся гомогенные белки молекулярной массой: 50, 48 и 52 кДа, соответственно. Также были определены изоэлектрические точки выделенных белков. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

Биохимические характеристики компонентов целлюлазного комплекса гриба *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D

Молекулярная масса белка, кДа	pI
25	4,0
43	3,9
48	4,2
50	4,0
52	4,5

Это значит, что после проведенной очистки целлюлазного комплекса гриба *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D были получены гомогенные белки с молекулярными массами: 25, 43, 48, 50 и 52 кДа. При этом надо отметить, что молекулярные массы выделенных нами целлюлаз близки к найденным ранее для других грибных целлюлаз (25–65 кДа) [11]. Например, молекулярная масса целлюлазы грибов *Phanerochaete chrysosporium* и *Cerrena unicolor* составляла 44 кДа [8], а *Volvariella volvacea* – 42 кДа [15]; целлюлазы же гриба *Chrysosporium lucknowense* также имеют молекулярные массы в диапазоне 25–65 кДа [1].

Как известно, целлобиогидролазы разрушают целлюлозу, последовательно отщепляя целлобиозные остатки с концов молекулы целлюлозы. Для них характерна высокая активность по отношению к кристаллическим субстратам – МКЦ (Авицел) и фильтровальной бумаге. Эти субстраты являются основными для определения активности целлобиогидролаз. Для эндоглюканаза же характерна высокая активность по отношению к КМЦ и β -глюкану [6, 34].

В связи с этим для определения субстратной специфичности выделенных ферментов были определены активности по отношению к ряду полисахаридных субстратов. Полученные данные представлены в таблице 3.

Таблица 3

Субстратная специфичность ферментов целлюлазного комплекса гриба *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D, ед/мг белка

Ферменты	КМЦ	β -глюкан	ФБ	МКЦ	пНФГ	Целлобиоза
ЭНГ 25 кДа	12,02±0,04	3,26±0,08	0,001±0	0,004±0,001	-	-
ЦБГ 43 кДа	0,01±0,01	0,03±0,04	0,091±0,021	0,180±0,021	-	0,004±0,001
ЭНГ 48 кДа	2,54±0,02	1,23±0,09	0,001±0,001	0,005±0,001	-	-
ЭНГ 50 кДа	5,10±0,05	4,71±0,06	-	0,010±0,002	-	-
ЦБГ 52 кДа	0,07±0,01	0,01±0	0,242±0,081	0,311±0,032	0,004±0,001	0,001±0,001

При исследовании субстратной специфичности выделенных целлюлаз гриба *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D (см. табл. 3) было выявлено, что белки с молекулярной массой 25, 48 и 52 кДа обладали высокой активностью по отношению к КМЦ, β -глюкану и низкой – к кристаллическим видам целлюлозы – фильтровальной бумаге и МКЦ. Поэтому, согласно классификации целлюлаз, их можно отнести к эндоглюканазам.

Белки с молекулярной массой 43 и 52 кДа были идентифицированы как целлобиогидролаза, поскольку они проявляли характерную активность по отношению к МКЦ и фильтровальной бумаге (0,24±0,08 ед/мг); при этом их эндоглюканазная активность была незначительной.

Заключение

Таким образом, в результате оптимизации состава [4] и условий культивирования удалось подобрать вариант с высоким выходом компонентов целлюлазного комплекса гриба *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3613D. Выделение и очистка ферментов в гомогенном виде для дальнейшего исследования их свойств позволили повысить удельную активность исследуемого целлюлазного комплекса в 10,9 раза по сравнению с исходной. Показано, что исследуемый гриб продуцирует несколько

типов целлюлаз – целлобиогидролазы с молекулярными массами 43 и 52 кДа и эндоглюканазы с молекулярными массами 25, 48 и 50 кДа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (грант FZRS-2020-0003).

Литература

1. Белова О.В., Лисов А.В., Винокурова Н.Г. и др. Ксиланаза и целлюлаза гриба *Cerrena unicolor* ВКМ F-3196: получение, свойства, применение для осахаривания растительного сырья // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Т. 50. – № 2. – С. 1–6.
2. Клесов А.А., Черноглазов В.М., Рабинович В.М. Способность целлюлаз к деградации целлюлозы как результат их эффективной адсорбции на субстрате: экспериментальное подтверждение и теоретическая интерпретация // Биохимия. – 2003. – № 48. – С. 1411–1420.
3. Ларина Л.Н. Направленный биосинтез ксиланазы микроскопическим грибом *Trichoderma viride* 44-11-62/3 и разработка получения технологии ферментного препарата: дис. ... канд. тех. наук. – М., 2006. – 202 с.
4. Левина Е.А., Атыкян Н.А., Ревин В.В. Влияние источников углеродного и азотного питания на биосинтез

- целлюлаз грибами *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 Д и *Trichoderma viride* ВКМ F-1131 // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2016. — № 1. — С. 85–93.
5. Рабинович М.Л., Мельник М.С., Болобова А.В. Целлюлазы микроорганизмов // Прикл. биохим. микробиол. — 2002. — № 38. — С. 355–373.
 6. Синуцын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Био-конверсия лигноцеллюлозных материалов. — М.: МГУ, 1995. — 224 с.
 7. Ariffin H., Abdullah N., Umi Kalson M.S. Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3 // International Journal of Engineering and Technology. — 2006. — Vol. 3. — Iss. 1. — P. 47–53.
 8. Baldrian P., Valášková V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi // FEMS Microbiol. Rev. — 2008. — Vol. 32. — Iss. 3. — P. 501–521.
 9. Brienzo M., Siqueira A.F., Milagres A.M.F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction // Biochem. Eng. J. — 2009. — Vol. 46. — P. 199–204.
 10. Chandel K., Jandaik S., Kumari V. et al. Isolation, purification and screening of cellulolytic fungi from mushroom compost for production of enzyme (cellulase) // International Journal of Current Research. — 2013. — Vol. 5. — Iss. 1. — P. 222–229.
 11. Chen P.J., Wei T.C., Chang Y.T. et al. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Sinorhizobium fredii* // Bot. Bull. Acad. Sin. — 2004. — Vol. 45. — P. 111–118.
 12. Clarke A.J. Biodegradation of cellulose. — Lancaster: Technomic Publishing Company Inc., 1997. — 272 p.
 13. Davison A., Blaxter M. Ancient origin of glycosyl hydrolase family 9 cellulase genes // Mol. Biol. Evol. — 2005. — Vol. 22. — P. 1273–1284.
 14. De Viries R.P., Viser J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 2001. — Vol. 65. — P. 497–552.
 15. Ding S., Ge W., Buswell J.A. Endoglucanase I from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. Purification, characterization, cloning and expression // Eur. J. Biochem. — 2001. — Vol. 268. — No. 22. — P. 5687–5695.
 16. Ebrahimi M., Caparanga A. R., Ordone E.E., et al. Effect of ammonium carbonate pretreatment on the enzymatic digestibility, structural characteristics of rice husk and bioethanol production via simultaneous saccharification and fermentation process with *Saccharomyces cerevisiae* Hansen 2055 // Ind. Crops Prod. — 2017. — Vol. 101. — P. 84–91.
 17. Gamarra N.N., Villena G.K., Gutiérrez-Correa M. Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — Vol. 87. — Iss. 2. — P. 545–551.
 18. Hussein M., Hossam A. Cellulase and Dairy Animal Feeding // Biotechnology. — 2010. — Vol. 9(3). — P. 238–286.
 19. Iqbal N.M.N., Ahmed I., Zia M.A. et al. Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulose produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility // Advances in Bioscience and Biotechnology. — 2012. — Vol. 2. — P. 149–156.
 20. Jiang X., Geng A., He N. et al. New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production // J. Biosci. Bioeng. — 2011. — Vol. 111. — P. 121–127.
 21. Jørgensen H., Eriksson T., Börjesson J. et al. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888 // Enzyme Microbiol. Technol. — 2003. — Vol. 32. — P. 851–861.
 22. Kamoldeen A.A., Lee C.K., Abdullah, W N.W., Leh C.P. Enhanced ethanol production from mild alkali-treated oil-palm empty fruit bunches via co-fermentation of glucose and xylose // Renewable Energy. — 2017. — Vol. 107. — P. 113–123.
 23. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1952. — Vol. 193. — Iss.1. — P. 265–275.
 24. Mandels M., Weber J. Production of cellulases // Adv. Chem. Series. — 1969. — Vol. 95. — P. 391–414.
 25. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // Analytical Chemistry. — 1959. — Vol. 31. — Iss. 3. — P. 426–428.
 26. Morán J., Alvarez V., Cyras V., Vázquez A. Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers // Cellulose. — 2008. — Vol. 15. — P. 149–159.
 27. Niranjane A.P., Madhou P., Stevenson T.W. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantea* // Enzyme and Microbial Technology. — 2007. — Vol. 40. — P. 1464–1468.
 28. Nwodo-Chinedu S., Okachi V.J., Smith H.A. et al. Effect of carbon sources on cellulase (E C 3.2.1.4) production by *Penicillium chrysogenum* PCL 501 // Afr. J. Biochem. — 2007. — Vol. 1. — Iss. 1. — P. 6–10.
 29. Ong L.G., Abd-Aziz S., Norani S. et al. Enzyme production and profile by *Aspergillus niger* during solid state fermentation using palm kernel cake as substrate // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2004. — Vol. 118. — P. 73–79.
 30. Ozioko P.C., Eze S.O.O., Chilaka F.C. Partial purification and characterization of cellulases from digestive tracts of the African giant snail (*Achatina achatina*) // Turkish Journal of Biology. — 2013. — Vol. 37. — P. 199–205.
 31. Shanmughapriya S., Kiran G.S., Selvin J. et al. Optimization, purification and characterization of extracellular mesophilic alkaline cellulase from sponge-associated *Marinobacter* sp. Ms1032 // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2009. — Vol. 162. — P. 625–640.
 32. Sharada R., Venkateswarlu G., Venkateshwar S. Production of cellulase — a review // International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences. — 2013. — Vol. 3. — Iss. 4. — P. 1070–1090.

33. Singhania R.R., Sukumaran R.K., Larroche C. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid state and submerged fermentation for microbial cellulases // *Enzy. Microb. Technol.* – 2010. – Vol. 46. – P. 541–549.
34. Zhang Y.H.P., Himmel M.E., Mielenz J.R. Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies // *Biotechnol. Adv.* – 2006. – Vol. 24. – P. 452–481.

References

- Belova OV, Lisov AV, Vinokurova NG i dr. Ksilanaza i tsellyulaza griba *Cerrena unicolor* VKM F-3196: polucheniye, svoystva, primeneniye dlya osakharivaniya rastitel'nogo syr'ya. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* 2014; 50(2):1–6 (in Russian).
- Klesov AA, Chernoglazov VM, Rabinovich VM. Spособnost' tsellyulaz k degradatsii tsellyulozy kak rezul'tat ikh effektivnoy adsorbtsii na substrate: eksperimental'noye podtverzheniye i teoreticheskaya interpretatsiya. *Biokhimiya* 2003; 48:1411–1420 (in Russian).
- Larina LN. Napravlenyy biosintez ksilanazy mikroskopicheskim gribom *Trichoderma viride* 44-11-62/3 i razrabotka polucheniya tekhnologii fermentnogo preparata: dis. ... kand. tekhn. nauk. Moscow, 2006: 202 (in Russian).
- Levina YeA, Atykhan NA, Revin VV. Vliyaniye istochnikov uglerodnogo i azotnogo pitaniya na biosintez tsellyulaz gribami *Lentinus tigrinus* VKM F-3616 D I *Trichoderma viride* VKM F-1131. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya* 2016; 1:85–93 (in Russian).
- Rabinovich ML, Mel'nik MC, Bolobova AB. Tsellyulazy mikroorganizmov. *Prikl biokhim mikrobiol* 2002; 38:355–373 (in Russian).
- Sinityn AP, Gusakov AV, Chernoglazov VM. Biokonversiya lignotsellyuloznykh materialov. Moscow: MGU, 1995: 224 (in Russian).
- Ariffin H, Abdullah N, Umi Kalson MS. Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *International Journal of Engineering and Technology* 2006; 3(1):47–53.
- Baldrian P, Valášková V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol. Rev* 2008; – Vol. 32(3):501–521.
- Brienzo M, Siqueira AF, Milagres AMF. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. *Biochem Eng J* 2009; 46:199–204.
- Chandel K, Jandaik S, Kumari V et al. Isolation, purification and screening of cellulolytic fungi from mushroom compost for production of enzyme (cellulase). *International Journal of Current Research* 2013; 5(1):222–229.
- Chen PJ, Wei TC, Chang YT et al. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Sinorhizobium fredii*. *Bot Bull Acad Sin* 2004; 45:111–118.
- Clarke AJ. Biodegradation of cellulose. Lancaster: Technomic Publishing Company Inc, 1997: 272.
- Davison A, Blaxter M. Ancient origin of glycosyl hydrolase family 9 cellulase genes. *Mol Biol Evol* 2005; 22:1273–1284.
- De Viries RP, Viser J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001; 65:497–552.
- Ding S, Ge W, Buswell JA. Endoglucanase I from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. Purification, characterization, cloning and expression. *Eur J Biochem* 2001; 268(22):5687–5695.
- Ebrahimi M, Caparanga A R, Ordone EE, et al. Effect of ammonium carbonate pretreatment on the enzymatic digestibility, structural characteristics of rice husk and bioethanol production via simultaneous saccharification and fermentation process with *Saccharomyces cerevisiae* Hansen 2055. *Ind Crops Prod* 2017; 101:84–91.
- Gamarra NN, Villena GK, Gutiérrez-Correa M. Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 87(2):545–551.
- Hussein M, Hossam A. Cellulase and Dairy Animal Feeding. *Biotechnology* 2010; 9(3):238–286.
- Iqbal NMN, Ahmed I, Zia MA et al. Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 2012; 2:149–156.
- Jiang X, Geng A, He N et al. New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. *J Biosci Bioeng* 2011; 111:121–127.
- Jørgensen H, Eriksson T, Börjesson J et al. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. *Enzyme Microbiol Technol* 2003; 32:851–861.
- Kamoldeen AA, Lee CK, Abdullah, W NW, Leh CP. Enhanced ethanol production from mild alkali-treated oil-palm empty fruit bunches via co-fermentation of glucose and xylose. *Renewable Energy* 2017; 107:113–123.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1952; 193(1):265–275.
- Mandels M, Weber J. Production of cellulases. *Adv Chem Series* 1969; 95:391–414.
- Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 1959; 31(3):426–428.
- Morán J, Alvarez V, Cyras V, Vázquez A. Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers. *Cellulose* 2008; 15:149–159.
- Niranjane AP, Madhou P, Stevenson TW. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantea*. *Enzyme and Microbial Technology* 2007; 40:1464–1468.

28. Nwodo-Chinedu S, Okachi VJ, Smith HA et al. Effect of carbon sources on cellulase (E C 3.2.1.4) production by *Penicillium chrysogenum* PCL 501. *Afr J Biochem* 2007; 1(1):6–10.
29. Ong LG, Abd-Aziz S, Norani S et al. Enzyme production and profile by *Aspergillus niger* during solid state fermentation using palm kernel cake as substrate. *Appl Biochem Biotechnol* 2004; 118:73–79.
30. Ozioko PC, Eze SOO, Chilaka FC. Partial purification and characterization of cellulases from digestive tracts of the African giant snail (*Achatina achatina*). *Turkish Journal of Biology* 2013; 37:199–205.
31. Shanmughapriya S, Kiran GS, Selvin J et al. Optimization, purification and characterization of extracellular mesophilic alkaline cellulase from sponge-associated *Marinobacter* sp. Ms1032. *Appl Biochem Biotechnol* 2009; 162:625–640.
32. Sharada R, Venkateswarlu G, Venkateshwar S. Production of cellulase – a review. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences* 2013; 3(4):1070–1090.
33. Singhania RR, Sukumaran RK, Larroche C et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzy Microb Technol* 2010; 46:541–549.
34. Zhang YHP, Himmel ME, Mielenz JR. Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol Adv* 2006; 24:452–481.

OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR CULTIVATION OF MUSHROOMS *LENTINUS TIGRINUS* VKM F-3616 D WITH THE PURPOSE OF INCREASING THE OUTPUT OF EXO- AND ENDOGLUCANASES

N.A. ATYKYAN¹, E.A. LEVINA¹, S.A. IBRAGIMOVA¹, S.V. APARIN², V.V. REVIN¹

¹ N.P. Ogarev Mordovia State University, Faculty of Biotechnology and Biology, Department of Biotechnology, Bioengineering and Biochemistry;

² N.P. Ogarev Mordovia State University, Faculty of Biotechnology and Biology, Department of Botany, Physiology and Plant Ecology, Saransk

The optimal cultivation conditions have been selected to ensure the maximum biosynthesis of cellulases by the wood-destroying fungus *Lentinus tigrinus* VKM F-3616 D: the initial pH of the nutrient medium is 5.0; cultivation temperature – 28 °C; the duration of cultivation is 7 days. Cellulases were isolated and purified to a homogeneous state, which made it possible to increase the specific activity of the investigated cellulase complex by 10.9 times compared to the initial one. Analysis of the properties of purified enzymes showed that the studied fungus produces several types of cellulases – exoglucanase (cellobiohydrolase) with molecular weights of 43 and 52 kDa and endoglucanase with molecular weights of 25, 48 and 50 kDa.

Keywords: cellulases, endocellulases, cellobiases, *Lentinus tigrinus*, optimization of cultivation conditions, isolation and purification of enzymes.

Address:

Atykyan N.A., Ph.D.

Associate Professor, N.P. Ogarev Mordovia State University, Saransk

E-mail: kistig2@yandex.ru

Для цитирования:

Н.А. Атыкян, Е.А. Левина, С.А. Ибрагимова, С.В. Апарин, В.В. Ревин. Оптимизация условий культивирования грибов *Lentinus tigrinus* VKM F-3616 D с целью увеличения выхода экзо- и эндоглюканаз. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(1):17–27.

For citation:

N.A. Atykyan, E.A. Levina, S.A. Ibragimova, S.V. Aparin, V.V. Revin. Optimization of conditions for cultivation of mushrooms *Lentinus tigrinus* VKM F-3616 D with the purpose of increasing the output of exo- and endoglucanases. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2021; 17(1):17–27 (in Russian).

ОСОБЕННОСТИ КОНТРОЛЯ ПАРОВОЙ СТЕРИЛИЗАЦИИ СБОРНЫХ ИЗДЕЛИЙ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

А.Д. БЕЛОУСОВ*, М.В. АНТОНЫЧЕВА, М.М. ЧАЛБУШЕВ, К.И. ХОЛМАТОВ,
Н.И. ВАХРУШИНА, С.В. АСТАФЬЕВА

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора,
Саратов

В зависимости от вида стерилизуемого объекта и применяемого оборудования выбраны средства контроля паровой стерилизации. Представлены результаты контроля режима стерилизации в автоматическом стерилизаторе сложных сборных изделий на основе лабораторных стеклянных бутылей, используемых при производстве лекарственных средств. Полученные данные послужили основой для валидации режима, который введен в промышленные регламенты производства лекарственных средств и медицинских изделий, выпускаемых РосНИПЧИ «Микроб».

Ключевые слова: паровая стерилизация, режим стерилизации, контроль стерилизации, объект стерилизации, сборное изделие.

Введение

Учитывая важность процесса стерилизации в подтверждении качества, эффективности и безопасности лекарственного средства (ЛС) и медицинского изделия (МИ) в рамках процедуры государственной регистрации, в состав технической документации включено требование о предоставлении «описания метода стерилизации, сведения о методах валидации в отношении процесса стерилизации» [8, 9]. Должно быть документированное подтверждение того, что в конкретных условиях стерилизационный режим может эффективно и воспроизводимо выполняться на конкретном оборудовании при определенной стерилизуемой загрузке, предусмотренной технологическим процессом.

В процессе производства в РосНИПЧИ «Микроб» ЛС и диагностических МИ не на всех технологических этапах возможно использование одноразовых стерильных емкостей. Применяются возвратные стеклянные бутыли с комплектом крышек и коннекторов («Duran», Германия; Borosil, Индия; Simax, Чехия) объемом 3, 5, 10 л и расходные материалы к ним, а также оригинальные металлические пробки с силиконовым уплотнением и трубками. Пример сложного сборного

изделия на основе лабораторных стеклянных бутылей представлен на рисунке 1.



Рис. 1. Сборное изделие с питательной средой для культивирования микроорганизмов

Сборные изделия применяют для культивирования микроорганизмов, для сбора и хранения промежуточного материала, для розлива профильтрованного препарата и других операций. Бутыли под ватно-марлевыми пробками используют на предварительных технологических этапах производства.

Емкости после использования обеззараживают в паровых стерилизаторах, потом разбирают, комплектующие очищают, моют и сушат в соответствии с нормативными требованиями [1, 2, 7]. Вновь смонтированные сборные изделия поступают на стерилизацию насыщенным водяным паром. Ранее на этом технологическом этапе использовался режим со стерилизационной выдержкой (90+5) мин при температуре (132±2) °С, который был

© 2021 г. Белоусов А.Д., Антонычева М.В., Чалбушев М.М., Холматов К.И., Вахрушина Н.И., Астафьева С.В.

* Автор для переписки:

Белоусов Алексей Дмитриевич

канд. биол. наук, научный сотрудник ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора

E-mail: ops@microbe.ru

разработан при эксплуатации паровых гравитационных стерилизаторов. Заполнение камеры паром и его проникновение, особенно в трубчатые изделия, на этих аппаратах малоэффективно. Поэтому для достижения гарантированной стерильности во всех трудностерилизуемых участках загрузки было многократно увеличено время стерилизационной выдержки. Этот режим приводил к преждевременному износу материалов и оборудования, увеличенному расходу энергии и рабочего времени, что в конечном итоге отражалось на себестоимости продукции.

Приведенный пример сборного изделия (см. рис. 1) относится к трудно стерилизуемым, и необходимо учитывать, что внутри изделий сложной формы и большой массы температура может быть ниже, чем в камере стерилизатора, и достигать необходимого значения с некоторым запаздыванием (временем выравнивания) [5, 6, 10]. Актуальным в таком случае становится разделение контроля условий стерилизации на «наружный» (в камере стерилизатора) и «внутренний» (внутри изделия).

В настоящее время в производстве ЛС и МИ в РосНИПЧИ «Микроб» используют автоматические форвакуумные стерилизаторы, позволяющие проводить заполнение камеры паром в циклическом режиме с равномерным распределением температурного поля по объему камеры. Для контроля работы парового форвакуумного стерилизатора и контроля эффективности режима стерилизации имеется достаточная номенклатура коммерческих зарегистрированных в Российской Федерации средств. Однако при решении конкретной практической задачи потребитель сталкивается с отсутствием единых рекомендаций по организации производственного контроля. Для каждого режима стерилизации в зависимости от характеристики объекта, его сложности с точки зрения проникновения насыщенного пара и исходной контаминации необходимо выбрать адекватный набор средств контроля, способный подтвердить соблюдение условий стерилизации и доказать ее эффективность.

Целью работы явился выбор средств контроля стерилизации и их экспериментальное применение для подтверждения эффективности режима со временем стерилизационной выдержки (20+2) мин при температуре (132±2) °С для сложных сборных изделий в автоматических форвакуумных стерилизаторах.

Материалы и методы

В работе использовали форвакуумный паровой стерилизатор Sterivar HP E-669 ED (Чехия) с автоматическим управлением режимами стерилизации и ос-

нащенный внутри камеры гибким датчиком температуры (РТ 3.1) [11]. В качестве моделей использовали пустую стеклянную бутылку емкостью 10 л под ватно-марлевой пробкой с бумажным колпачком и сложное сборное изделие на основе стеклянной бутылки 10 л с системой силиконовых трубок с фильтром и заглушками, монтируемых на герметичной металлической пробке (рис. 2).

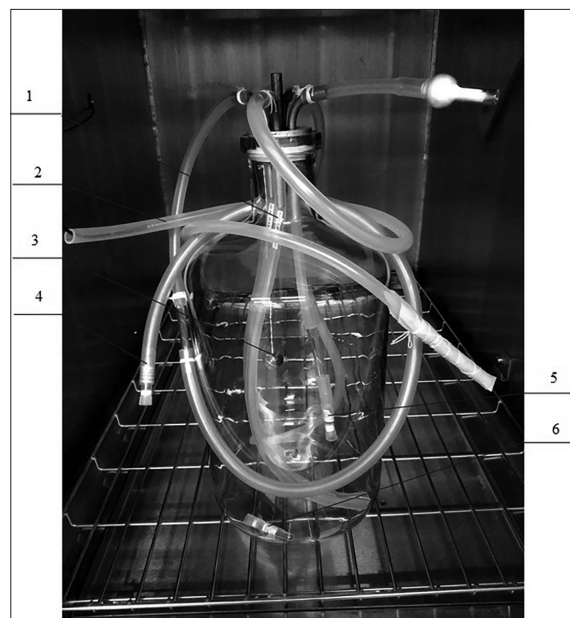


Рис. 2. Сборное изделие с датчиками температуры и индикаторами контроля процесса стерилизации. 1 – Хеликс-тест-Винар, 2 – датчик РТ 3.1, 3 – регистратор, 4 – АБИ1, 5 – АБИ2, 6 – АБИЗ

Выбран режим стерилизации со временем стерилизационной выдержки (20+2) мин при температуре (132±2) °С, который рекомендован для стерилизации лабораторной посуды и заложен в программное обеспечение медицинского автоматического стерилизатора [7]. При этом обеспечивается уровень гарантированной стерильности в 10^{-6} , что является достаточным в производственной практике [3, 4].

Соблюдение параметров режима и эффективность стерилизации контролировали по комплексу результатов физико-химических и бактериологических средств, как в камере парового стерилизатора, так и внутри стерилизуемого объекта.

Температура в камере стерилизатора измерялась штатным датчиком стерилизатора (РТ 1.2). Его показания высвечивались на дисплее стерилизатора и печатались на чеке-протоколе цикла стерилизации. Показания гибкого датчика температуры (РТ 3.1) считывали с дисплея стерилизатора (Меню – Изображение блоков – Изображение блока камеры) (рис. 3).

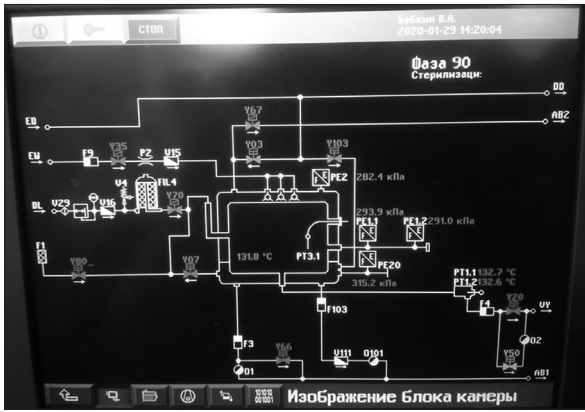


Рис. 3. Показания датчиков температуры РТ 1.2 и РТ 3.1 во время стерилизационной выдержки

Измерение температуры внутри бутылки в процессе стерилизации проводили с помощью автономного цифрового регистратора температуры TR-2E в защитной капсуле «Thermochron protector». Регистратор и адаптер для связи с персональным компьютером (ПК) входят в состав измерительного комплекса «Автоклав-Рег-К», зарегистрированного в Государственном реестре средств измерений РФ [12].

Параметры измерений регистратора (текущее время, точность, интервал и длительность) выбирали на ПК. После измерений информацию с регистратора считывали с помощью адаптера на ПК.

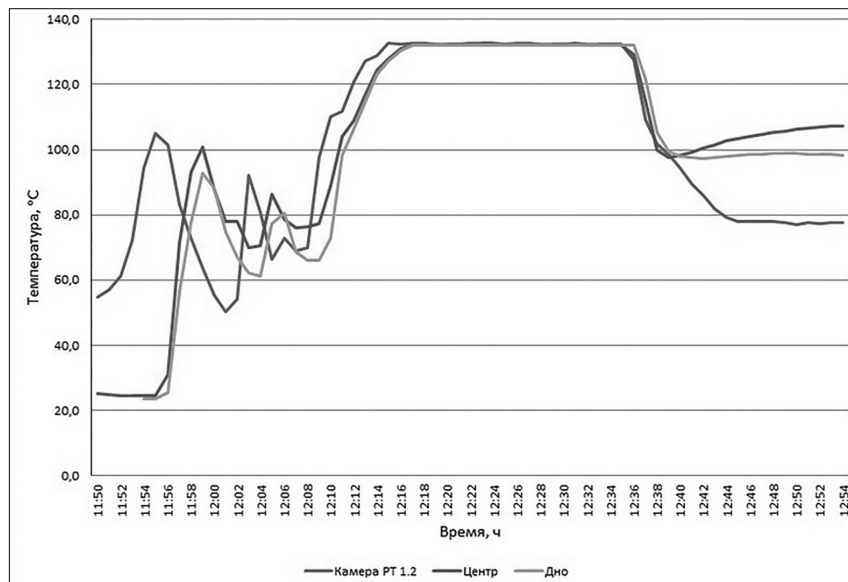


Рис. 4. График изменения температуры при стерилизации бутылей, режим 132/20

Температура $(132 \pm 2)^\circ\text{C}$ во время стерилизационной выдержки поддерживается во всех участках внутри бутылки в течение не менее 20 мин. Изменение цвета мекток химиндикаторов по сравнению с эталоном сравнения показало соблюдение критических параметров стерилизации. Биологический индикатор не изменил свой цвет

Для контроля режима стерилизации использовали интегрирующие химические индикаторы 5-го класса («ТерраМед») и автономные биологические одноразовые индикаторы (АБИ) «Биостер пар 132/20» («БиоТест-Пушино»). Для испытания на полноту удаления воздуха при стерилизации трубчатой загрузки использовали «Хеликс-тест-Винар», относящийся к специальным индикаторам класса 2, который помещали внутрь силиконовых трубок монтажа.

Результаты и обсуждение

Задача заключалась в измерении температуры в процессе стерилизации в наиболее трудно прогреваемых участках внутри бутылки и силиконовых трубок. Температура этих участков должна достигать значения $(132 \pm 2)^\circ\text{C}$ и поддерживаться в течение не менее 20 мин. Регистратор помещали на дне и на середине высоты по центру внутри пустой бутылки. На дне бутылки размещали также биологический индикатор. Бутылку закрывали ватно-марлевой пробкой с бумажным колпачком. Среди других аналогичных бутылей ее помещали в камеру стерилизатора при максимальной загрузке. График изменения температуры внутри емкости и в камере стерилизатора приведен на рисунке 4.

после стерилизации и инкубации. Это свидетельствует об инактивации спорных тест-микроорганизмов. Контрольный индикатор, не подвергавшийся стерилизации, после инкубации изменил свой цвет на желтый.

По совокупным результатам контроля можно сделать вывод, что выбранный режим стерилизации,

включая этапы предварительной откачки и заполнения камеры паром, является достаточным.

Следующим этапом было обоснование предлагаемого режима для стерилизации сложного сборного изделия, содержащего стеклянную емкость, и монтируемых с ней дополнительных элементов. Наличие длинных силиконовых трубок (не менее 1,5 м) с диаметром не более 8 мм, закрытых ватно-марлевыми пробками или имеющих на концах другие элементы, усложняет проникновение пара в объект. Необходимо было использовать средства контроля, позволяющие подтвердить соблюдение условий стерилизации.

Внутри бутылки на середину ее высоты по центру помещали цифровой регистратор. Гибкий датчик РТ

3.1 вводили внутрь силиконовой трубки на 30–40 см и трубку закрывали ватно-марлевой пробкой (см. рис. 2).

Химические индикаторы помещали в контрольные точки камеры снаружи бутылей, а «Хеликс-тест-Винар» — внутрь силиконовых трубок. Автономные биологические индикаторы размещали на дне бутылки и в полости силиконовых трубок, находящихся вне и внутри емкости. Бутыль помещали в камеру при максимальной загрузке среди других аналогичных емкостей.

График изменения температуры в камере, внутри трубки и на середине высоты по центру бутылки представлен на рисунке 5. Из экспериментальных данных можно сделать вывод, что температура во всех точках достигает значения $(132 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение не менее 20 мин.

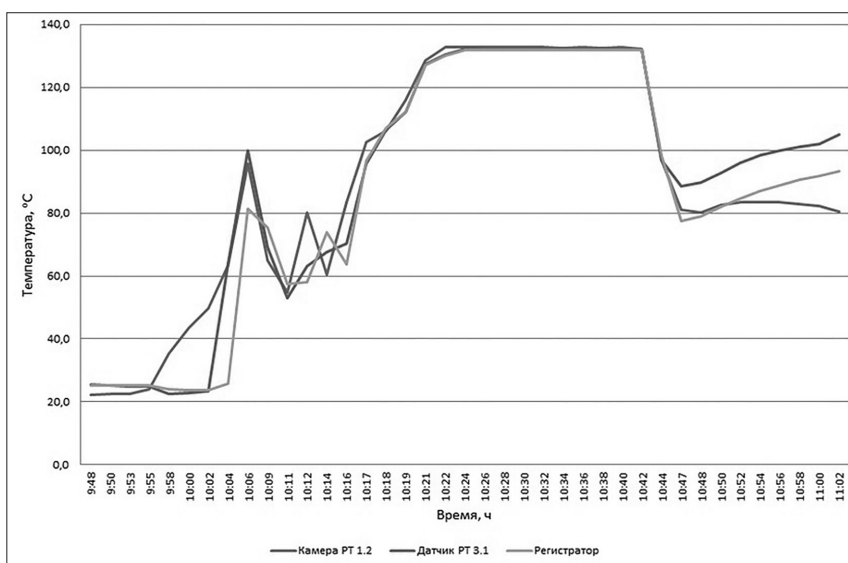


Рис. 5. График изменения температуры при стерилизации сложного сборного изделия, режим 132/20

Изменение цвета меток химиндикаторов «Терра-Мед» и «Хеликс-тест-Винар» по сравнению с эталоном сравнения показало соблюдение критических параметров стерилизации: температуры, времени стерилизационной выдержки, наличие водяного насыщенного пара. Биологические индикаторы «Биостер пар 132/20» в точках № 1, 2, 3 не изменили свой цвет после стерилизации и инкубации при 55°C . Это свидетельствует об инактивации спорных тест-микроорганизмов. Контрольный индикатор, не подвергавшийся стерилизации, после инкубации изменил свой цвет на желтый (рис. 6).

Анализ данных с датчиков температуры в совокупности с результатами химических и биологических индикаторов позволяют сделать вывод, что во всех точках сложного сборного изделия, труднодоступного для проникновения водяного насыщенного пара, соблюдены условия эффективной стерилизации.



Рис. 6. Контроль эффективности режима стерилизации биологическими индикаторами. К — АБИ контроль, 1 — АБИ из трубки вне бутылки; 2 — АБИ из трубки в полости бутылки, 3 — АБИ со дна бутылки

Заключение

Таким образом, выбран оптимальный комплекс средств контроля и доказана эффективность режима стерилизации насыщенным водяным паром при температуре $(132+2)^\circ\text{C}$ и продолжительности времени стерилизационной выдержки $(20+2)$ мин для лабораторных стеклянных бутылей и сложных сборных изделий на их основе. Уменьшилась продолжительность полного цикла стерилизации, по сравнению с ранее применявшимся режимом. Полученные данные послужили основой для валидации режима, который введен в промышленные регламенты производства лекарственных средств и медицинских изделий, выпускаемых РосНИПЧИ «Микроб».

Литература

1. Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. — 75 с.
2. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014. — 195 с.
3. Бойцов А.Г., Гречанинова Т.А., Косякова К.Г. Валидация процессов стерилизации или контроль стерильности? // Дезинфекционное дело. — 2008. — № 4. — С. 59–61.
4. Васильев Н.С., Абрамова И.М., Васильев В.Н., Смолькина О.Н. и др. Применение устройств контроля процесса стерилизации — путь к повышению надежности стерилизационных мероприятий // Дезинфекционное дело. — 2018. — № 2. — С. 23–28.
5. Иванов С.М., Андреев В.С., Абрамова И.М., Дьяков В.В. Выбор химических индикаторов для контроля условий стерилизации внутри и снаружи стерилизуемых изделий // Дезинфекционное дело. — 2004. — № 3. — С. 68–71.
6. Иванов С.М. Некоторые вопросы применения химических индикаторов контроля стерилизации // Дезинфекционное дело. — 2001. — № 1. — С. 38–40.
7. Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения № МУ-287-113: утв. Минздравом РФ 30.12.1998 г./ сост. И.М. Абрамова, Л.Г. Пантелеева, Л.С. Федорова и др. — М.: Интерсэн, 2000. — 67 с.
8. Об утверждении Правил надлежащей производственной практики: приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 (ред. от 18.12.2015). URL: <https://sudact.ru/law/prikaz-minpromtorga-rossii-ot-14062013-n-916/> (дата обращения: 26.11.20 г.).

9. Об утверждении требований к содержанию технической и эксплуатационной документации производителя (изготовителя) медицинского изделия: приказ Минздрава России от 19.01.2017 № 11н (ред. от 22.04.2019). URL: <https://roszdravnadzor.gov.ru/i/upload/images/2020/4/3/1585874110.80692-1-1253.rtf> (дата обращения: 26.11.20 г.).
10. Савенко С.М., Бойко Л.С., Васильев Н.С., Демидов П.А. Производственный контроль паровой стерилизации изделий медицинского назначения в лечебно-профилактических учреждениях // Дезинфекционное дело. — 2005. — № 2. — С. 40–45.
11. Савенко С.М., Васильев Н.С., Лямкина О.Д. Большие паровые стерилизаторы для стерилизации изделий медицинского назначения // Дезинфекционное дело. — 2005. — № 2. — С. 33–39.
12. Устройства термохрон: НТП Элин. URL: <https://elin.ru> (дата обращения: 17.03.2020).

References

1. Bezopasnost' raboty s mikroorganizmami III-IV grupp patogennosti (opasnosti) i vzbuditelyami parazitarnykh bolezney. Sanitarno-epidemiologicheskiye pravila SP 1.3.2322-08. Moscow: Federal'nyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2009: 75 (in Russian).
2. Bezopasnost' raboty s mikroorganizmami I-II grupp patogennosti (opasnosti). Sanitarno-epidemiologicheskiye pravila SP 1.3.3118-13. Moscow: Federal'nyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2014: 195 (in Russian).
3. Boytsov AG, Grechaninova TA, Kosyakova KG. Validatsiya protsessov sterilizatsii ili kontrol' steril'nosti? Dezinfektsionnoye delo 2008(4):59–61 (in Russian).
4. Vasil'yev NS, Abramova IM, Vasil'yev VN, Smol'kina ON i dr. Primeneniye ustroystv kontrolya protsessa sterilizatsii — put' k povysheniyu nadezhnosti sterilizatsionnykh meropriyatij. Dezinfektsionnoye delo 2018(2):23–28 (in Russian).
5. Ivanov SM, Andreyev VS, Abramova IM, D'yakov VV. Vybor khimicheskikh indikatorov dlya kontrolya usloviy sterilizatsii vnutri i snaruzhi sterilizuyemykh izdeliy. Dezinfektsionnoye delo 2004(3):68–71 (in Russian).
6. Ivanov SM. Nekotoryye voprosy primeneniya khimicheskikh indikatorov kontrolya sterilizatsii. Dezinfektsionnoye delo 2001(1):38–40 (in Russian).
7. Metodicheskiye ukazaniya po dezinfektsii, predsterilizatsionnoy ochistke i sterilizatsii izdeliy meditsinskogo naznacheniya № MU-287-113: utv. Minzdravom RF 30.12.1998 g/ sost IM Abramova, LG Panteleyeva, LS Fedorova i dr. Moscow: Intersen, 2000: 67 (in Russian).
8. Ob utverzhdenii Pravil nadlezhashchey proizvodstvennoy praktiki: prikaz Minpromtorga Rossii ot 14.06.2013 № 916 (red ot 18.12.2015). URL: <https://sudact.ru/law/prikaz-minpromtorga-rossii-ot-14062013-n-916/>

- prikaz-minpromtorga-rossii-ot-14062013-n-916/ (data obrashcheniya: 26.11.20 g) (in Russian).
9. Ob utverzhdenii trebovaniy k sodержaniyu tekhnicheskoy i ekspluatatsionnoy dokumentatsii proizvoditelya (izgotovitel'ya) meditsinskogo izdeliya: prikaz Minzdrava Rossii ot 19.01.2017 № 11n (red ot 22.04.2019). URL: <https://roszdravnadzor.gov.ru/i/upload/images/2020/4/3/1585874110.80692-1-1253.rtf> (data obrashcheniya: 26.11.20 g) (in Russian).
 10. Savenko SM, Boyko LS, Vasil'yev NS, Demidov PA. Proizvodstvennyy kontrol' parovoy sterilizatsii izdeliy meditsinskogo naznacheniya v lechebno-profilakticheskikh uchrezhdeniyakh. *Dezinfektsionnoye delo* 2005(2):40–45 (in Russian).
 11. Savenko SM, Vasil'yev NS, Lyamkina OD. Bol'shiye parovyye sterilizatory dlya sterilizatsii izdeliy meditsinskogo naznacheniya. *Dezinfektsionnoye delo* 2005(2):33–39 (in Russian).
 12. Ustroystva termokhron: NTP Elin. URL: <https://elin.ru> (data obrashcheniya: 17.03.2020) (in Russian).

FEATURES OF STEAM STERILIZATION CONTROL FOR ASSAMBLIED PRODUCTS IN MANUFACTURING PHARMACEUTICALS

A.D. BELOUSOV, M.V. ANTONYCHEVA, M.M. CHALBUSHEV, K.I. KHOLMATOV,
N.I. VAKHRUSHINA, S.V. ASTAF'IEVA

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Rospotrebnadzor, Saratov

Depending on the type of object to be sterilized and the equipment used, steam sterilization controls have been selected. The results of sterilization mode control in an automatic sterilizer in regard to complex assembled products based on laboratory glass bottles used in the production of medicines are described in the paper. The data obtained served as a basis for validation of regime, which is introduced into manufacturing specifications for the production of pharmaceuticals and medical products released by the Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe».

Keywords: steam sterilization, sterilization mode, control of sterilization, the object of sterilization, prefabricated product.

Address:

Belousov A.D., Ph.D.

Researcher Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of Rospotrebnadzor

E-mail: ops@microbe.ru

Для цитирования:

А.Д. Белоусов, М.В. Антонычева, М.М. Чалбушев, К.И. Холматов, Н.И. Вахрушина, С.В. Астафьева. Особенности контроля паровой стерилизации сборных изделий при производстве лекарственных средств. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2021; 17(1):28–33.

For citation:

A.D. Belousov, M.V. Antonycheva, M.M. Chalbushev, K.I. Kholmatov, N.I. Vakhrushina, S.V. Astaf'ieva. Features of steam sterilization control for assembled products in manufacturing pharmaceuticals. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2021; 17(1):28–33 (in Russian).

ПРИМЕНЕНИЕ СЕЛЕКТИВНОЙ МАГНИТНОЙ СОРБЦИИ ПРИ ИНДИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ МЕТОДОМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Е.А. КОТЕНЕВА*, А.В. КАЛИНИН, Т.В. ЖАРНИКОВА, О.А. ГНУСАРЕВА,
И.В. ЖАРНИКОВА, А.С. ГЕОГДЖАЯН, С.А. КУРЧЕВА, О.И. ЦЫГАНКОВА,
Е.С. КОТЕНЕВ, А.В. АБРАМОВИЧ

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь

Представлено описание алгоритма селективного концентрирования и пробоподготовки микроорганизмов на примере *F. tularensis* для детекции методом MALDI-TOF MS анализа. Изложена последовательность проведения исследования, включающая в себя селективное концентрирование и выделение патогена методом специфической магнитной сорбции, обеззараживание образцов и проведение масс-спектрометрического анализа с использованием мишени MSP Anchor Chip 96, которая позволяет дополнительно сконцентрировать образец, повышая чувствительность исследования. Для идентификации используются как коммерческие базы данных, так и in-house варианты, разработанные для выявления микроорганизмов I–II групп патогенности. Применение на стадии пробоподготовки железосодержащего сорбента позволяет избавиться от матричных эффектов и повысить селективность анализа.

Ключевые слова: MALDI-TOF масс-спектрометрия, магнитные сорбенты, туляремия, лабораторная диагностика, *F. tularensis*, масс-спектры, базы данных.

Введение

В настоящее время идентификация микроорганизмов проводится бактериологическими, молекулярно-генетическими и серологическими методами [5]. Развитие времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) изменило подход к рутинной идентификации микроорганизмов в микробиологических лабораториях. Времяпролетная масс-спектрометрия отличается высокой точностью и скоростью проведения анализа, низкой стоимостью и возможностью автоматизации анализа, что важно как в исследовательских работах, так и в рутинной практике работы клинических и бактериологических лабораторий [7, 10].

При применении этой технологии анализируются спектральные характеристики белковых молекул, пре-

имущественно рибосомальных белков, являющихся уникальным «отпечатком пальца» конкретного микроорганизма [1, 14]. Идентификация проходит путем сопоставления масс-спектров белковой фракции образца с базой данных эталонных спектров, которая может быть как коммерческой, содержащей спектры многих известных микроорганизмов, так и исследовательской, созданной для идентификации и исследования определенного патогена [13]. Усилия современных исследователей направлены на адаптацию данного метода к исследованию биологического материала и объектов окружающей среды, минуя стадию выделения чистой бактериальной культуры [11, 12].

Образцы объектов окружающей среды (вода, погладки, земля и т.д.) представляют особую трудность для индикации патогена непосредственно в материале. Это может быть связано с низкой концентрацией патогена в образце, наличием посторонней микрофлоры и ингибиторов, затрудняющих проведение анализа. Решить эти проблемы можно путем селективного извлечения целевых аналитов на стадии пробоподготовки образца с использованием сорбентов, что позволяет сократить число подготовительных этапов анализа, удалить загрязнители и ингибиторы, повысить чувствительность метода [4, 8]. Перспективны сорбционные системы, сочетающие сорбент-реагент-элюент, обеспечивающие

© 2021 г. Котенева Е.А., Калинин А.В., Жарникова Т.В., Гнусарева О.А., Жарникова И.В., Геогджаян А.С., Курчева С.А., Цыганкова О.И., Котенев Е.С., Абрамович А.В.

* **Автор для переписки:**

Котенева Елена Анатольевна
канд. биол. наук, заведующий лабораторией постгеномных технологий Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора

E-mail: postgenom_stv@mail.ru

количественное извлечение патогенов и их десорбцию. В этом случае не требуется проведение длительного и трудоемкого разложения концентратов, становится осуществимым многократное использование сорбента и определение возбудителя в элюате.

Использование сорбентов с магнитными свойствами дает возможность провести предварительное концентрирование и очистку от посторонних примесей, что приводит к усовершенствованию процесса пробоподготовки [2].

Материалы и методы

В работе использовали штаммы *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *F. tularensis* 890-Аз, *F. tularensis* Schu, полученные из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. Культуры возбудителя *F. tularensis* выращивали на Ft агаре при температуре $37 \pm 0,5$ °С в течение 48–72 ч.

Экспериментальные работы проводили с использованием образцов полевого материала и объектов окружающей среды, собранных в результате командировок по эпизоотологическому обследованию курируемых территорий: образцы сена (3), блох (12), клещей (9), воды (6), погадок животных (4 шт).

Для селективного концентрирования использовали активированные и модифицированные магнитные иммунные сорбенты (МИС), полученные по ранее разработанной нами методике [12]. Сорбент получен в результате синтеза FeSO_4 , активирован 2% раствором полиглокина, модифицирован 0,1% раствором вторичного алкилсульфата натрия и иммобилизован с туляремийными иммуноглобулинами для селективного концентрирования возбудителя туляремии. Регенерацию и очистку МИС проводили следующим образом: сорбент инкубировали в 0,1 М буферном растворе с рН 1,5–2,0 в течение 10 мин. Далее пять-шесть раз промывали 0,1 М фосфатно-солевым буферным раствором (ФосСБ) с рН 7,2–7,4.

Культуру *F. tularensis* суспендировали в дистиллированной воде по стандарту мутности 10 МЕ и отбирали 50 мкл, переносили в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл, добавляли 50 мкл активированных МИС и доводили до объема 300 мкл. Пробирку встряхивали на вортексе 2 раза в течение времени инкубации (20 минут). Благодаря тому, что частицы МИС имеют высокую магнитную восприимчивость, разделение можно осуществить в одну стадию с помощью магнита, без центрифугирования или фильтрации. После окончания времени

инкубации сорбент дважды отмывали дистиллированной водой в объеме 1 мл от несвязавшихся антигенов. Далее вносили 50 мкл элюирующего раствора — 0,03 М КОН на 10 мин и, используя магнитный штатив, переносили надосадочную жидкость в чистую микропробирку.

Параллельно проводили постановку контрольных проб: контроль магнитных сорбентов (без инкубации с микробной взвесью) и контроль микробной взвеси (отсутствие магнитных сорбентов).

Обеззараживание штаммов *F. tularensis* и экстракцию кислоторастворимых белков проводили по ранее предложенному методу [3]. Дополнительно лизат фильтровали через PVDF фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Далее в фильтрат добавляли равный объем 50% ацетонитрила, после чего использовали для MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа. Для контроля специфической стерильности белковых экстрактов штаммов *F. tularensis* их нейтрализовали [9] и делали контрольные высевы каждого образца на 5 чашек с Ft-агаром, которые инкубировали в течение 10 суток при 37 °С с ежедневным просмотром посевов. Во время проверки на специфическую стерильность образцы белковых экстрактов хранили при -80 °С. Все работы с культурами *F. tularensis* проводили в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» [6].

В работе были использованы питательные среды: Ft-агар (Оболенск, Россия), Tryptic soy broth (Liofilchem, Italy), Microbiology agar (Sigma, USA); реактивы: L-histidine (Amresco LLC), TWEEN-80, pure (AppliChem, Germany), TFA (trifluoroacetic acid spectroscopy grade, ultrapure) (AppliChem, Germany), Acetonitrile (HPLC-gradient grade), «Bacterial Test Standart» (Bruker Daltonics Germany), α -циано-4-гидроксикоричную кислоту (HCCA) (Bruker Daltonics Germany), спирт этиловый (ГОСТ Р 51652-2000).

Получение масс-спектров экстрактов клеток *F. tularensis* осуществляли с помощью времяпролетного масс-спектрометра Microflex LRF «Bruker Daltonics», работающего на основе технологии MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization). Использовались следующие параметры прибора: метод сбора спектров MBT_Process, диапазон детекции масс 1800–22000 Da, мощность лазера — 20–60%. Для калибровки прибора применяли коммерческий стандарт Bruker Bacterial Test Standard. В работе использовали мишени двух типов: MSP 96 Polished Steel Targets и MSP Anchor Chip 96 (Bruker Daltonics, Germany). Для сокристаллизации образца на мишени применяли раствор матрицы HCCA

(α -гидроксикоричной кислоты). Сбор масс-спектров проводили с помощью программного обеспечения Flex Control (v.3.3) (Bruker Daltonics, Germany) в автоматическом или ручном режимах. Анализ и обработку масс-спектров проводили с использованием программного обеспечения Flex Analysis (v.3.3). Сборку суперспектров проводили из 20 единичных масс-спектров в программе MALDI Biotyper v. 3.0. по стандартному алгоритму. Идентификация образцов происходила в автоматическом режиме в программном обеспечении MALDI Biotyper Real time Classification (v.3.1) (Bruker Daltonics, Germany) с использованием электронной базы данных «Белковые профили масс-спектры микроорганизмов I–II групп патогенности» ГР № 2-16620345 и электронной базы данных «Протеомные

профили штаммов *Francisella tularensis* sp. *holarctica*, выделенные на территории природного очага туляремии в Ставропольском крае, и референтных штаммов сравнения в среде программы Biotyper v. 3.0.» ГР № 2019620236. Идентификацию образцов проводили в автоматическом режиме в программной среде Biotyper RTC V 3.1.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных масс-спектрометрических исследований с использованием мишени MSP 96 Polished Steel Targets штаммы *F. tularensis* не прошли видовую идентификацию, так как давали значения $SV \leq 1,6$, что недостаточно для видовой идентификации (рис. 1).

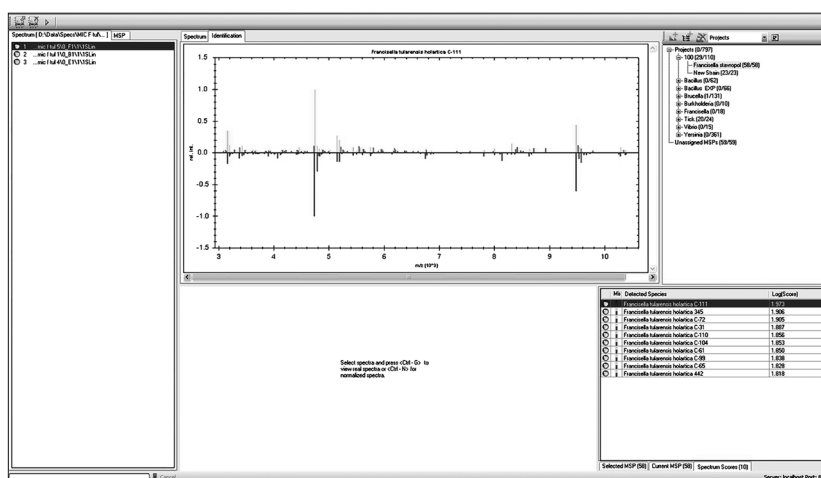


Рис. 1. Идентификация полученных спектров в ПО Biotyper V 3.1 с использованием мишени MSP 96 Polished Steel

Положительный результат идентификации штаммов был получен при использовании мишени MSP Anchor Chip 96, которая сконструирована таким образом, что точка нанесения образца представляет собой поверхность диаметром 0,4–2 мм, окруженную гидрофобной зоной по периметру, вследствие чего минимальная площадь гидрофильной поверхности позволяет сконцентрировать материал исследуемого образца, повышая чувствительность исследования. Наличие гидрофобной зоны вокруг места нанесения образца предотвращает его «растекание» по поверхности мишени, а также отталкивает полярные органические растворители, что способствует повышению эффективности сбора масс-спектров. Применение технологии MSP Anchor Chip позволило получить качественные спектры и собрать их в автоматическом режиме с последующей идентификацией образцов в автоматическом режиме в программном обеспечении MALDI Biotyper Real time Classification (v.3.1) (Bruker

Daltonics, Germany). Данные представлены на рисунке 2. Значение коэффициента повысилось с 1,3 до 2,334 (достоверная видовая идентификация).

Эксперименты проводились с чистыми культурами, пробами, контаминированными штаммами туляремии в разной концентрации (10^8 – 10^3 м.к./мл), а также с образцами полевого материала и объектов окружающей среды. В результате получены данные о количестве материала, необходимого для исследования (100 мкл – 100 мл), длительности инкубации образца с концентрирующим сорбентом (30 мин для объемов до 50 мл и 2–3 ч для объемов 100 мл и выше). На серийных разведениях бактериальных взвесей оценены такие показатели, как чувствительность и воспроизводимость метода. Чувствительность метода MALDI-TOF MS за счет применения технологии селективной иммуносорбции удалось повысить с 10^5 до 10^3 м.к./мл. Воспроизводимость спектров носила стабильный характер между сериями независимых экспериментов (2 повтора).

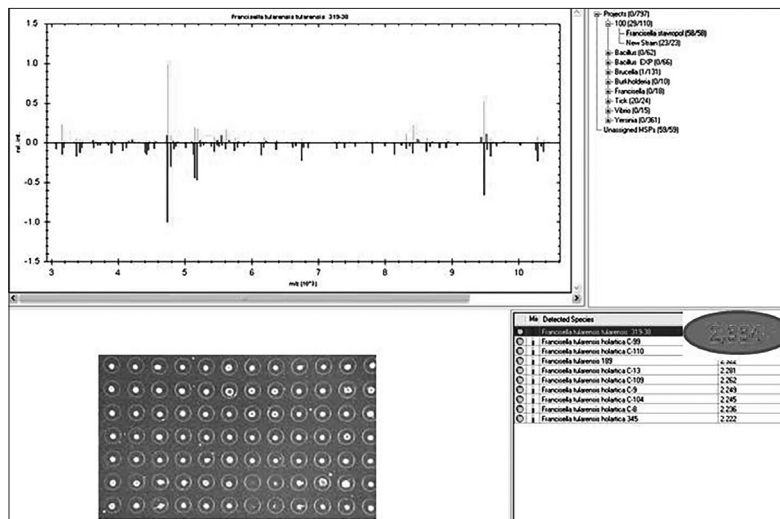


Рис. 2. Идентификация полученных спектров в ПО Biotyper V 3.1 с использованием мишени MSP Anchor Chip 96 и технологии селективной магнитной сорбции

В результате проведенных экспериментов с чистыми культурами *F. tularensis* и контаминированными пробами получены идентичные положительные данные. При исследовании образцов из объектов окружающей среды (34 пробы из природного очага туляремии) получено 2 положительных результата, подтвержденных методом ПЦР. Выявить возбудителя туляремии бактериологическим и серологическими методами (РНГА, РИФ, ИФА), без предварительного селективного концентрирования не удалось, так как концентрация возбудителя в данных объектах окружающей среды (вода) ниже чувствительности вышеперечисленных методов.

В настоящее время работа ведется в направлении совершенствования процесса пробоподготовки на этапе отмывки элюированных образцов от мелкодисперсных магнитных частиц, которые, оставаясь в растворе, препятствуют получению качественных спектров в автоматическом режиме. Сборка спектров в ручном режиме проходит для 100% образцов, в автоматическом — в 30–50% случаев. Для большинства исследованных образцов полевого материала наблюдалось совпадение результатов, полученных методом MALDI-TOF MS и генетическими и/или серологическими методами.

Заключение

Для получения 100% воспроизводимых результатов сейчас продолжается разработка методических приемов по сочетанному применению селективного концентрирования микроорганизмов из объектов окружающей среды на магнитном иммуносорбенте с последующей детекцией методом MALDI-TOF масс-спектрометрическим анализом, которые обеспечат возможность исследовать образцы с высокой степенью загрязнения, неограничен-

ного объема, низкой концентрации патогена, с высокой чувствительностью, выявляемостью, что значительно повысит достоверность результатов исследований и позволит усовершенствовать эпизоотологический и эпидемиологический мониторинг возбудителей инфекций.

Литература

1. Баранцевич Е.П., Баранцевич Н.Е. Применение MALDI-TOF масс-спектрометрии в клинической микробиологии // Трансляционная медицина. — 2014. — № 3. — С. 23–28.
2. Жарникова И.В., Курчева С.А., Жарникова Т.В., Котенева Е.А., Геогджаян А.С., Гнусарева О.А., Калинин А.В., Цыганкова О.И., Кошкидько А.Г. Применение сорбентов в подготовке образцов для масс-спектрометрического анализа (обзор) // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2020. — Т. 16. — № 1. — С. 40–50.
3. Жарникова И.В., Курчева С.А., Жарникова Т.В., Котенева Е.А., Гнусарева О.А., Геогджаян А.С., Кошкидько А.Г., Калинин А.В., Котенев Е.С. Подготовка и контроль магнитных сорбентов для осуществления пробоподготовки патогенов в масс-спектрометрии // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: матер. III Всеросс. науч.-практ. конф. с международным участием (24–25 апр. 2019 г.) / [под ред. А.Н. Куличенко]. — Ставрополь: Экспо-Медиа, 2019. — С. 262–263.
4. Краснов Н.В., Лютвинский Я.И., Подольская Е.П. Масс-спектрометрия с мягкими методами ионизации в протеомном анализе (обзор) // Научное приборостроение. — 2010. — Т. 20. — № 4. — С. 5–20.
5. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: практическое руководство / Под ред. академика РАМН Г.Г. Онищенко, академика РАМН В.В. Кутырева. — Изд. 2-е, переработанное и дополненное. — М.: ЗАО «Шик», 2013. — 560 с.

6. СП 1.3.31180-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.10.2013 № 64.
7. Clark A., Kaleta E. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2013. – Vol. 26. – No. 3. – P. 547–603.
8. Elkadi M., Shokry H., Hashim A. Immobilization of magnetic nanoparticles onto amine-modified nano-silica gel for copper ions remediation // *Materials (Basel)*. – 2016. – Vol. 9(6). – P. 460. doi: 10.3390/ma9060460.
9. Lasch P., Nattermann H., Elchard M., et al. MALDI-TOF mass-spectrometry compatible inactivation method for highly pathogenic microbial cells and spores // *Analytical Chemistry*. – 2008. – Vol. 80. – P. 2026–2034.
10. Panda A. et al. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers // *Journal of Microbiological Methods*. – 2015. – Vol. 109. – P. 93–105.
11. Rodríguez-Sánchez B., Sánchez-Carrillo C., Ruiz A., et al. Direct identification of pathogens from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2014. – Vol. 20(7): O421–O427. doi:10.1111/1469-0691.12455.
12. Segawa S., Sawai S., Murata S., Nishimura M., Beppu M., Sogawa K., et al. Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis // *Clin. Chim. Acta*. – 2014. – Vol. 435. – P. 59–61.
13. Singhal N., Kumar M., Kanaujia P.K., Virdi J.S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis // *Front Microbiol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 791. doi:10.3389/fmicb.2015.00791.
14. Van Veen S.Q., Claas E.C.J., Kuijper Ed. J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 48(3). – P. 900–907.
- dlya osushchestvleniya probopodgotovki patogenov v mass-spektrometrii. Aktual'nyye problemy bolezney, obshchikh dlya cheloveka i zhivotnykh: mater. III Vseross. nauch.-prakt. konf. s mezhdunarodnym uchastiyem (24–25 apr. 2019) [pod red AN Kulichenko]. Stavropol': Ekspo-Media, 2019: 262–263 (in Russian).
4. Krasnov NV, Lyutvinskiy YAI, Podol'skaya YeP. Mass-spektrometriya s myagkimi metodami ionizatsii v proteomnom analize (obzor). *Nauchnoye priborostroyeniye* 2010; 20(4):5–20 (in Russian).
5. Laboratornaya diagnostika opasnykh infektsionnykh bolezney: prakticheskoye rukovodstvo. Pod red akademika RAMN GG Onishchenko, akademika RAMN VV Kutyreva. Izd 2-ye, pererabotannoye i dopolnennoye. Moscow: ZAO «Shik», 2013: 560 (in Russian).
6. SP 1.3.31180-13 «Bezopasnost' raboty s mikroorganizmami I–II grupp patogennosti (opasnosti)», utverzhdennyye postanovleniyem Glavnogo gosudarstvennogo sanitarnogo vracha Rossiyskoy Federatsii ot 28.10.2013 № 64.
7. Clark A, Kaleta E et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 2013; 26(3):547–603.
8. Elkadi M, Shokry H, Hashim A. Immobilization of magnetic nanoparticles onto amine-modified nano-silica gel for copper ions remediation. *Materials (Basel)* 2016; 9(6):460. doi: 10.3390/ma9060460.
9. Lasch P, Nattermann H, Elchard M, et al. MALDI-TOF mass-spectrometry compatible inactivation method for highly pathogenic microbial cells and spores. *Analytical Chemistry* 2008; 80:2026–2034.
10. Panda A et al. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. *Journal of Microbiological Methods* 2015; 109:93–105.
11. Rodríguez-Sánchez B, Sánchez-Carrillo C, Ruiz A, et al. Direct identification of pathogens from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect* 2014; 20(7): O421–O427. doi:10.1111/1469-0691.12455.
12. Segawa S, Sawai S, Murata S, Nishimura M, Beppu M, Sogawa K, et al. Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. *Clin. Chim. Acta* 2014; 435. – P. 59–61.
13. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol* 2015; 6. – P. 791. doi:10.3389/fmicb.2015.00791.
14. Van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper Ed J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol* 2010; 48(3). – P. 900–907.

References

1. Barantsevich YeP, Barantsevich NYe. Primeneniye MALDI-TOF mass-spektrometrii v klinicheskoy mikrobiologii. *Translyatsionnaya meditsina* 2014; 3:23–28 (in Russian).
2. Zharnikova IV, Kurcheva SA, Zharnikova TV, Koteneva YeA, Geogdzhayan AS, Gnusareva OA, Kalinin AV, Tsygankova OI, Koshkid'ko AG. Primeneniye sorbentov v podgotovke obraztsov dlya mass-spektrometricheskogo analiza (obzor). *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im. Yu.A. Ovchinnikova* 2020; 16(1):40–50 (in Russian).
3. Zharnikova IV, Kurcheva SA, Zharnikova TV, Koteneva YeA, Gnusareva OA, Geogdzhayan AS, Koshkid'ko AG, Kalinin AV, Kotenev YeS. Podgotovka i kontrol' magnitnykh sorbentov

THE USE OF SELECTIVE MAGNETIC SORPTION IN THE INDICATION OF THE CAUSATIVE AGENT OF TULAREMIA BY MALDI-TOF MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS

E.A. KOTENEVA, A.V. KALININ, T.V. ZHARNIKOVA, O.A. GNUSAREVA,
I.V. ZHARNIKOVA, A.S. GEOGJAYAN, S.A. KURCHEVA, O.I. TSYGANKOVA,
E.S. KOTENEV, A.V. ABRAMOVICH

Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol

A description of the algorithm for selective concentration and sample preparation of microorganisms, using the example of *F. tularensis*, for detection by MALDI-TOF MS analysis is presented. The sequence of the study is described, including selective concentration and isolation of the pathogen by specific magnetic sorption, disinfection of samples and mass spectrometric analysis using the MSP Anchor Chip 96 target, which allows additional concentration of the sample, increasing the sensitivity of the study. For identification, both commercial databases and in-house variants developed for the identification of microorganisms of groups I–II of pathogenicity are used. The use of an iron-containing sorbent at the sample preparation stage allows you to get rid of matrix effects and increase the selectivity of the analysis.

Keywords: MALDI-TOF mass spectrometry, magnetic sorbents, tularemia, laboratory diagnostics, *F. tularensis*, mass spectra, databases.

Address:

Koteneva E.A., Ph.D.
Head of the laboratory of post-genomic technologies,
Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor
E-mail: postgenom_stv@mail.ru

Для цитирования:

Е.А. Котенева, А.В. Калинин, Т.В. Жарникова, О.А. Гнусарева, И.В. Жарникова, А.С. Геогджаян, С.А. Курчева, О.И. Цыганкова, Е.С. Котенев, А.В. Абрамович. Применение селективной магнитной сорбции при индикации возбудителя туляремии методом MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(1):34–39.

For citation:

E.A. Koteneva, A.V. Kalinin, T.V. Zharnikova, O.A. Gнусareva, I.V. Zharnikova, A.S. Geogjayan, S.A. Kurcheva, O.I. Tsygankova, E.S. Kotenev, A.V. Abramovich. The use of selective magnetic sorption in the indication of the causative agent of tularemia by MALDI-TOF mass spectrometric analysis. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(1):34–39 (in Russian).

МЕТОД MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БИОПЛЕНОК ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ

О.С. ЧЕМИСОВА*, М.В. ПОЛЕЕВА

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

Парагемолитические вибрионы — условно-патогенные галофильные микроорганизмы, обитающие преимущественно в соленых водоемах и изолируемые из различных морепродуктов. Употребление в пищу зараженных морепродуктов способно вызывать заболевания у людей, протекающие по типу гастроэнтерита. Способность бактерий к формированию биопленок приводит к тому, что «биопленочные» штаммы демонстрируют множественную лекарственную устойчивость, что представляет собой потенциальную угрозу для здоровья человека. Метод MALDI-TOF масс-спектрометрии может использоваться не только для идентификации микроорганизмов, но и для проведения внутривидового типирования. Цель работы — изучение возможности использования метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации биопленок парагемолитических вибрионов и сравнительная характеристика белковых спектров «планктонных» и «биопленочных» форм на разных биотических субстратах. Показано, что в процессе перехода штаммов *Vibrio parahaemolyticus* из «планктонной» в «биопленочную» форму наблюдаются изменения фенотипических свойств, в том числе масс-спектров, что влияет на достоверность идентификации вибрионов методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Видовая идентификация штаммов возможна только после проведения бактериологического посева.

Ключевые слова: MALDI-TOF масс-спектрометрия, *Vibrio parahaemolyticus*, биопленка, субстрат, композитный индекс корреляции, кластерный анализ, дендрограмма.

Введение

В настоящее время метод MALDI-TOF масс-спектрометрии активно используется в практике микробиологических лабораторий для видовой идентификации культур микроорганизмов. Кроме того, масс-спектрометрия позволяет анализировать различные биомолекулы: белки, липиды, полисахариды, нуклеиновые кислоты [2, 4, 14, 16, 18].

При проведении анализа масс-спектров бактериальных штаммов возможно выявление пиков, характерных не только для вида, но и для определенных штаммов, что позволяет использовать метод масс-спектрометрического анализа для внутривидового типирования [4]. Использование кластерного анализа и композитного индекса корреляции — Composite Correlation Index (CCI) дает возможность проводить внутривидовую дифференциацию. Присутствие в масс-спектрах определенных пиков

может коррелировать с наличием у микроорганизмов факторов патогенности (адгезинов, токсинов, гемолизинов), быстрое определение которых необходимо для выбора правильной тактики лечения [5, 16].

Кроме факторов патогенности и вирулентности, немаловажным феноменом является способность микроорганизмов к формированию биопленок. Биопленка представляет собой совокупность микробных клеток, которые связаны с поверхностью и заключены в матрицу преимущественно полисахаридной природы и могут образовываться на самых разных поверхностях, таких как живые ткани, медицинские изделия, трубопроводы [9]. Граница раздела фаз «твердое вещество-жидкость» обеспечивает идеальную среду для прикрепления и роста микроорганизмов.

Ежегодно в мире вылавливается и потребляется свыше 100 миллионов тонн морепродуктов [13], которые относятся к скоропортящимся и представляют опасность для здоровья из-за загрязнения патогенами [23]. *Vibrio parahaemolyticus* является наиболее распространенным возбудителем, обитающим на морепродуктах (креветки, рыба, моллюски) и способным вызвать серьезные заболевания у людей [1, 7, 19, 20, 22]. Занимая различные экологические ниши, парагемолитические вибрионы благодаря наличию одного полярного жгутика могут

© 2021 г. Чемисова О.С., Полева М.В.

* Автор для переписки:

Чемисова Ольга Сергеевна

к.б.н., врио заместителя директора по научной работе ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону

E-mail: chemisova@inbox.ru

существовать в воде как в планктонной форме, так и быть прикрепленными к инертным частицам, таким как зоопланктон, рыбы, моллюски и ракообразные [6]. Способность *V. parahaemolyticus* к формированию биопленок приводит к тому, что штаммы демонстрируют множественную лекарственную устойчивость, устойчивость к дезинфектантам, что представляет собой потенциальную угрозу для здоровья человека [24]. Формируя биопленки, микроорганизмы могут быть в 1000 раз более устойчивыми к стрессу, чем планктонные формы [11, 12].

Разными авторами были получены данные, свидетельствующие о достоверных различиях белкового состава «биопленочных» и «небиопленочных» форм микроорганизмов родов *Candida*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus pneumoniae* и других [10, 17, 21, 25], в связи с чем актуальным представляется изучение с использованием масс-спектрометрического анализа наличия маркеров «биопленочных» и «небиопленочных» форм параземолитических вибрионов.

Целью работы явилось изучение возможности использования метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации биопленок параземолитических вибрионов и сравнительная характеристика белковых спектров планктонных и биопленочных форм на разных биотических субстратах.

Материалы и методы

Штаммы. В работе были исследованы штаммы *V. parahaemolyticus*, характеристика которых приведена в таблице 1. Штаммы имели как природное, так и клиническое происхождение и различались по наличию основного фактора патогенности параземолитических вибрионов — наличию гена *tdh* — прямого термостабильного гемолизина *V. parahaemolyticus*. Все штаммы были получены из коллекции Музея живых культур с Центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Таблица 1

Характеристика штаммов *V. parahaemolyticus*, использованных в работе

№ п/п	№ штамма в коллекции	Генетическая характеристика	Объект выделения	Место и год выделения
1	13331	<i>tdh+</i> <i>trh-</i>	человек	Япония, 1971 г.
2	14704	<i>tdh-</i> <i>trh-</i>	рыба	Азовское море, 1984 г.
3	14810	<i>tdh+</i> <i>trh-</i>	человек	г. Новороссийск, 1976 г.
4	16696	<i>tdh-</i> <i>trh-</i>	морская вода	г. Новороссийск, 1973 г.
5	19013	<i>tdh+</i> <i>trh-</i>	человек	г. Бердянск, 1988 г.
6	19149	<i>tdh-</i> <i>trh-</i>	морская вода	г. Находка, 2009 г.

Питательные среды. Для культивирования штаммов использовали 1% пептонную воду с 2% NaCl (рН 7,8); 2% агар Мартена с 2% NaCl (рН 7,7); 0,3% агар Мартена с 2% NaCl (рН 7,7).

Биотические субстраты. В качестве субстратов использовали чешую рыбы и хитиновый экзоскелет креветки, которые нарезали пластинами 5×5 мм, автоклавировали при 130 °С, 1,5 атм в течение 60 минут.

Культивирование биопленки. Из суточной агаровой культуры штаммов *V. parahaemolyticus* готовили взвесь 10⁹ (микробных клеток/мл) мк.кл./мл. Во флаконы с 50 мл морской воды и субстратами добавляли взвесь вибрионов до конечной концентрации во флаконе 10⁴ мк.кл./мл. Параллельно проводили высев

на твердую питательную среду для определения КОЕ/мл. В качестве контроля все исследуемые штаммы засеивали во флаконы с 50 мл морской воды без субстратов. Флаконы инкубировали при комнатной температуре (t=25–27 °С).

На 6-е сутки культивирования для проведения масс-спектрометрического анализа отбирали по 0,3 мл из контрольных проб. Из опытных флаконов стерильно отбирали фрагменты хитина и чешуи, трижды отмывали физиологическим раствором (рН 7,2) от несвязавшихся клеток, избавлялись от излишков влаги с помощью фильтровальной бумаги и помещали в 0,3 мл дистиллированной воды. Также отбирали по 0,3 мл проб планктонных микроорганизмов. После этого проводили

экстракцию этанолом/муравьиной кислотой. В качестве матрицы использовали α -циано-гидроксикоричную кислоту.

На 10-е сутки культивирования биотические субстраты высевали методом «отпечатков» [8], высев планктонных образцов всех штаммов проводили по 0,1 мл на твердую питательную среду. Посевы инкубировали в течение 24 часов при 37 °С и использовали для проведения масс-спектрометрического анализа. В качестве контроля использовали испытуемые штаммы, хранящиеся на пробирках с 0,3% агаром Мартена с 2% NaCl. Для осуществления масс-спектрометрии готовили взвесь 10⁹ мк.кл./мл выросших штаммов биоупленки и планктона. После этого проводили экстракцию этанолом/муравьиной кислотой. В качестве матрицы использовали α -циано-гидроксикоричную кислоту.

MALDI-TOF-масс-спектрометрия. MALDI-TOF масс-спектрометрию проводили с использованием масс-спектрометра «Autoflex speed III Bruker Daltonics» (Германия) с программным обеспечением: FlexControl — программа для управления времяпролетными масс-спектрометрами серии flex компании Bruker; Flex Analysis — программа для ручного анализа полученных масс-спектров (визуальное сопоставление, оценка качества масс-спектров, калибровка); Biotyper — программа для обработки и анализа масс-спектров, полученных на масс-спектрометрах фирмы Bruker для анализа общего индекса корреляции спектров, кластерного анализа спектров.

Видовую идентификацию проводили с использованием базы белковых спектров компании Bruker. Вероятность соответствия исследуемого спектра известному таксону определяется показателем Score: высокая достоверность видовой идентификации характеризуется Score $\geq 2,000$; высокая достоверность родовой идентификации — Score от 1,700 до 1,999 [2].

Результаты и обсуждение

Согласно литературным данным, в практике клинических лабораторий возможно использование масс-спектрометрического анализа как экспресс-метода для проведения идентификации микроорганизмов в биологических жидкостях (кровь, моча) без предварительного выделения культуры [3, 15]. Парагемолитические вибрионы способны к образованию биоупленки на биотических поверхностях, таких как чешуя рыб, хитиновые покровы моллюсков, а при развитии вибриозов у рыб возбудитель выделяется из биологического материала практически в чистом виде. Учитывая это, нами в каче-

стве модели для эксперимента получена биоупленка чистой культуры парагемолитических вибрионов на чешуе рыб и хитиновом панцире креветок, и в качестве контроля — планктонная форма — взвесь вибрионов в стерильной морской воде. Нами была оценена возможность проведения идентификации путем осуществления прямого масс-спектрометрического анализа с биотического субстрата без предварительного посева на питательные среды. Проведенный масс-спектрометрический анализ непосредственно субстратов и планктона после культивирования на них штаммов *V. parahaemolyticus* показал невозможность идентификации штаммов из «планктонных» проб и пластинок хитина и чешуи.

Для того чтобы оценить степень изменений, возникающих у штаммов при формировании биоупленок, биотические субстраты высевали методом «отпечатков» — ОБ (отпечаток биоупленки), а «планктонные» образцы (ПО) всех штаммов — по 0,1 мл на твердую питательную среду. Выросшие штаммы идентифицировали с помощью масс-спектрометрического анализа. В результате идентификации культур после одного пассажа из ПО и ОБ парагемолитических вибрионов из всех исследуемых проб в автоматическом режиме все они, независимо от их формы («планктонная» или «биоупленочная») и от субстратов, были отнесены к виду *V. parahaemolyticus* с показателями Score выше 2,000, что свидетельствует о высокой достоверности определения вида.

При сравнении масс-спектров штамма *V. parahaemolyticus*, выросшего после пассажа отпечатка биоупленки на питательной среде, и непосредственно биоупленки *V. parahaemolyticus* на пластинке чешуи, видно несовпадение пиков (рис. 1). Вероятно, это связано с наличием примесей пептидов — продуктов гидролиза самих субстратов (например, коллагена чешуи), дающих при масс-спектрометрии фоновые пики. Также необходимо учитывать тот факт, что при внесении спектров в базы данных используются суточные культуры, более длительное культивирование в составе биоупленок может приводить к изменениям белкового спектра.

Также был проведен сравнительный анализ белковых масс-спектров штаммов *V. parahaemolyticus* после посева из различных модельных образцов (рис. 2). Все штаммы, независимо от субстратов, имели общие пики, отличающиеся по интенсивности. Так как метод масс-спектрометрии позволяет проводить анализ преимущественно консервативных рибосомальных белков, специфичных для микроорганизмов, состав которых не зависит от условий существования, это объясняет сходство белковых масс-спектров.

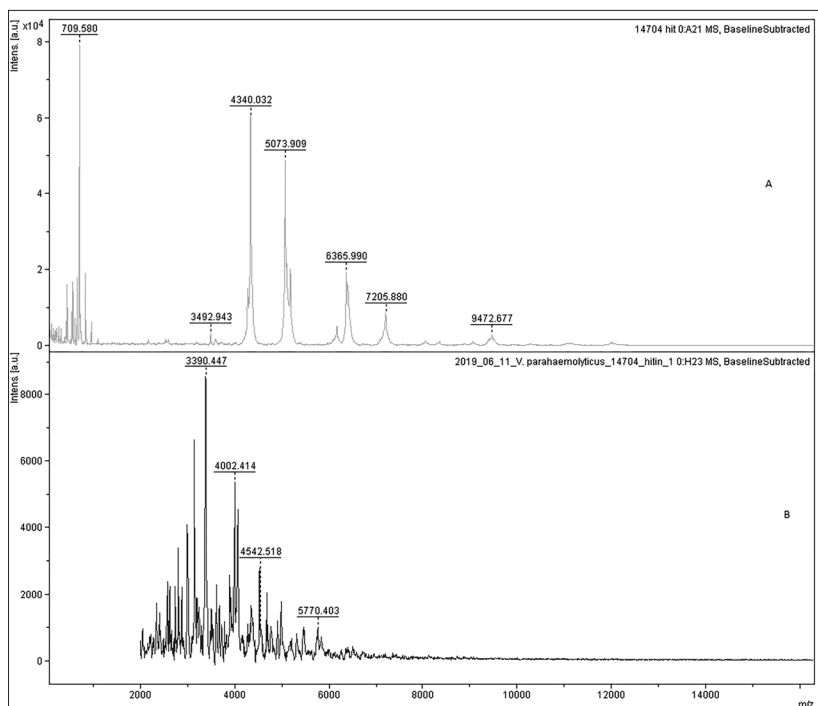


Рис. 1. Сравнительный анализ масс-спектров *V. parahaemolyticus* 14704. По горизонтали: соотношение m/z (масса/заряд); по вертикали: интенсивность пиков. А — штамм, выросший после отпечатка пластинки чешуи; В — пластинка чешуи после культивирования с *V. parahaemolyticus*

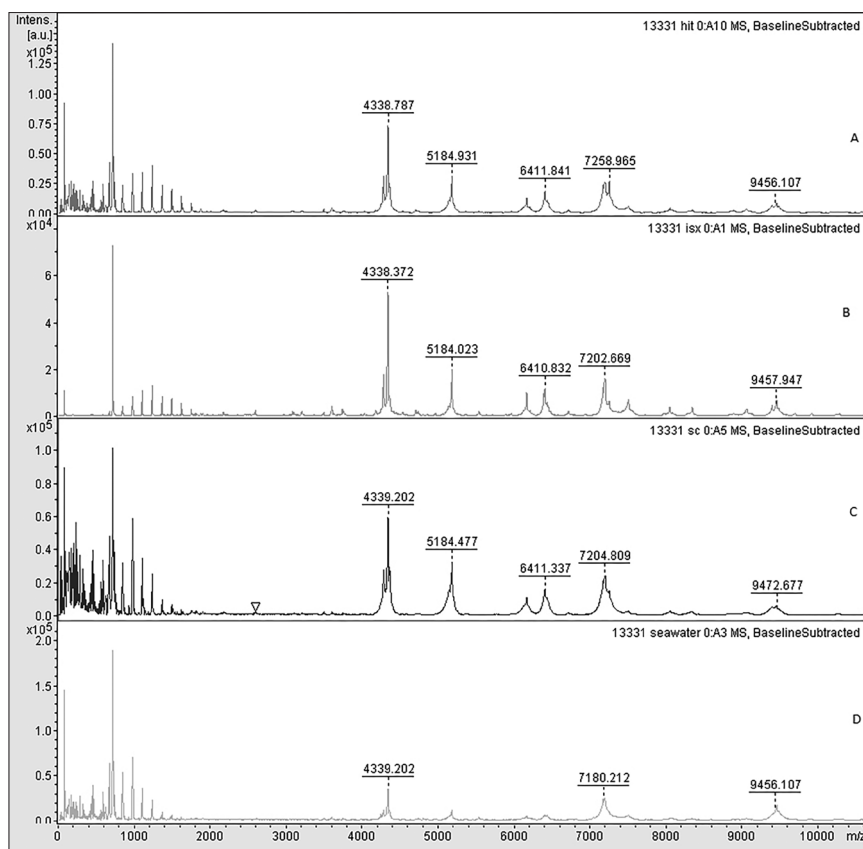


Рис. 2. Масс-спектры «биоленочных» и «планктонных» форм штамма *V. parahaemolyticus* 13331. По горизонтали: соотношение m/z (масса/заряд); по вертикали: интенсивность пиков. А — штамм, выросший после отпечатка пластинки хитина; В — контроль штамма; С — штамм, выросший после отпечатка пластинки чешуи; D — штамм, культивируемый на морской воде

Сходство между масс-спектрами штаммов *V. parahaemolyticus* после посева модельных образцов было изучено путем построения корреляционной матрицы в программе Biotyper (Bruker Daltonics) (рис. 3) и вычисления композитного индекса корреляции (CCI) (табл. 2). Значения CCI, близкие к 1, свидетельствуют о высокой степени сходства спектров, значения, близкие к 0, — о четких различиях. В матрице цвет ячеек соответствует значению CCI (1,0 — коричневый, далее по мере уменьшения оранжевый, желтый, зеленый, синий).

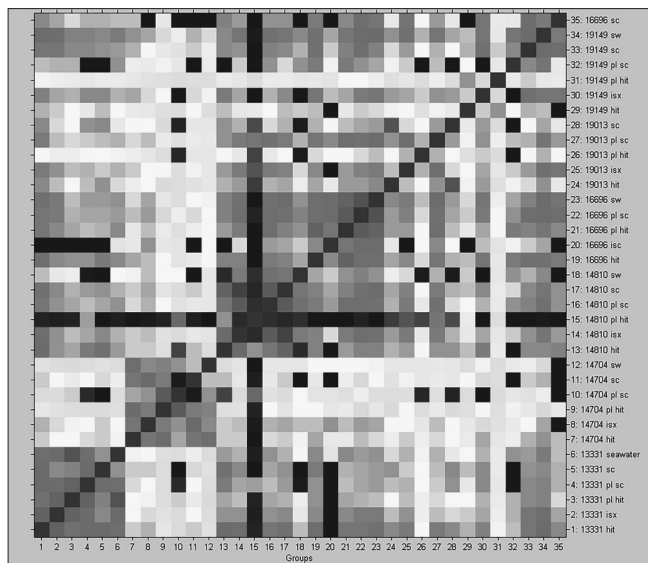


Рис. 3. Корреляционная матрица «био пленочных» и «планктонных» форм штаммов паразитических вибрионов. По горизонтали: варианты штаммов; по вертикали: варианты штаммов; hit — «био пленочная» форма штамма на хитине; isx — штамм, выросший на питательной среде; pl hit — «планктонная» форма штамма на хитине; pl sc — «планктонная» форма штамма на чешуе; sc — «био пленочная» форма штамма на чешуе; sw — штамм, выросший в морской воде

Индекс корреляции для спектров ПО и ОБ у изученных штаммов составил от 0,022 до 0,955 (см. табл. 2). Наибольшие различия наблюдались у исходного штамма *V. parahaemolyticus* 16696 и у его «био пленочной» формы, выращенной на чешуе (CCI=0,022). Самый стабильный белковый масс-спектрометрический состав отмечался у штамма *V. parahaemolyticus* 14810 при переходе в «био пленочную» форму на чешуе (CCI=0,955).

Наименьшие изменения в масс-спектрах зарегистрированы у штаммов, пассированных в модели морской воды, в то время как попадание штамма на субстрат приводило к изменениям спектра, возможно, из-за смены питательных веществ как следствие активации других ферментов (хитиназ, протеиназ и др.).

Таблица 2

Композитный индекс корреляции масс-спектров «планктонных» и «био пленочных» штаммов *V. parahaemolyticus*

№ штамма	Условия выращивания	Штамм из морской воды	«Биопленочный» штамм на чешуе	«Биопленочный» штамм на хитине
1	2	4	5	7
13331	исходный штамм	0,881**	0,770***	0,893**
14704	исходный штамм	0,778***	0,887**	0,820**
14810	исходный штамм	0,813**	0,955*	0,877**
16696	исходный штамм	0,864**	0,022****	0,771**
19149	исходный штамм	0,817**	0,837**	0,683****

Примечание: * — 0,999–0,900 (оранжевый); ** — 0,899–0,800 (желтый); *** — 0,799–0,700 (зеленый); **** — 0,699–0,600 (голубой); ***** — менее 0,600 (синий)

С помощью программы Biotyper 3.1 на основе масс-спектрометрических профилей штаммов построена MSP-дендрограмма (рис. 4). Культуры разделены на 2 кластера, к кластеру А относились штаммы с генотипической характеристикой *tdh+trh-*, выделенные из объектов окружающей среды и гидробионтов. К кластеру В относились как «планктонная», так и «био пленочная» форма штаммов *V. parahaemolyticus* *tdh+trh-* из клинического материала, а также одни из штаммов *tdh-trh-* из морской воды. Таким образом, анализ дендрограммы свидетельствует, что изменения масс-спектров не зависели от субстрата и формирования биопленки вибрионами, то есть носили неспецифический разнонаправленный характер.

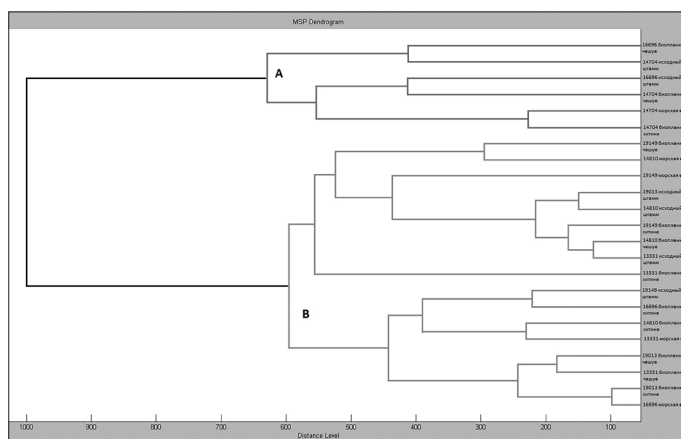


Рис. 4. MSP дендрограмма «био пленочных» и «планктонных» форм штаммов *V. parahaemolyticus*. По горизонтали: дистанция; по вертикали: варианты штаммов

Заключение

Изменения масс-спектров штаммов парагемолитических вибрионов в процессе перехода в «био пленочную» форму влияют на достоверность идентификации вибрионов методом MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа. Вероятно, это связано с наличием примесей пептидов — продуктов гидролиза самих субстратов (например, коллагена чешуи), дающих при масс-спектрометрии фоновые пики. Также необходимо учитывать тот факт, что при внесении спектров в базы данных используются суточные культуры и более длительное культивирование в составе биопленок может приводить к изменениям белкового спектра. При этом отмечено отсутствие корреляции между изменениями в масс-спектрах и формой существования микробных клеток, субстратом для образования биопленок. Для проведения масс-спектрометрического анализа с целью идентификации культур парагемолитических вибрионов необходим предварительный бактериологический высеv исследуемого материала на стандартизованные питательные среды.

Литература

1. Беленева И.А., Масленникова Э.Ф., Магарламов Т.Ю. Физиолого-биохимические свойства галофильных вибрионов *Vibrio parahaemolyticus* и *V. alginolyticus*, изолированных из гидробионтов залива Петра Великого Японского моря // Биология моря. — 2004. — Т. 30. — № 2. — С. 114–119.
2. Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В., Маянский Н.А. Возможности, проблемы и перспективы масс-спектрометрических технологий в медицинской микробиологии (обзор литературы) // Клин. лаб. диагностика. — 2016. — Т. 61. — № 4. — С. 249–256.
3. Ломинадзе Г.Г., Семенова Е.А., Мотузова О.В., Калакуцкая А.Н., Лазарева А.В. Использование метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для ускорения идентификации микроорганизмов в гемокультурах пациентов с подозрением на сепсис // Лаборатория ЛПУ. — 2014. — № 4. — С. 17–20.
4. Полеева М.В., Чемисова О.С., Писанов Р.В., Цырулина О.А. Способ получения препарата прямого термостабильного гемолизина (ТДН) *Vibrio parahaemolyticus* // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2018. — Т. 14. — № 4. — С. 27–32.
5. Рыковская О.А. Молекулярно-биологическая характеристика и совершенствование идентификации и дифференциации *Vibrio parahaemolyticus* и *Vibrio alginolyticus*: дис. ... канд. биол. наук. — Ростов-на-Дону: Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, 2016. — 153 с.
6. Скитович Г.С., Шадрова Н.Б., Прунтова О.В. *Vibrio parahaemolyticus*: распространение, выявление и методы

идентификации // Ветеринария сегодня. — 2015. — № 3(14). — С. 66–70.

7. Тарасенко Т.Т., Косенок Е.В., Кривоногова В.А., Шевердина Ф.Н. Заболеваемость прочими кишечными инфекциями в Приморском крае // Здоровье. Медицинская экология. Наука. — 2016. — Т. 3. — № 66. — С. 127–134.
8. Титова С.В., Веркина Л.М. Моделирование биопленок холерного вибриона на твердых поверхностях (стекло и пластик) и визуализация их в световом и люминесцентном микроскопах // Клиническая и лабораторная диагностика. — 2016. — Т. 61. — № 4. — С. 238–241.
9. Шварц Т.А. Биопленки как микробное сообщество // Вестник Курганского государственного университета. — 2015. — Вып. 7. — № 1. — С. 41–44.
10. Allegrucci M., Hu F.Z., Shen K., Hayes J., Ehrlich G.D., Post J.C., Sauer K. Phenotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* biofilm development // J. Bacteriol. — 2006. — Vol. 188(7). — P. 2325–2335.
11. Ashrafudoulla M., Furkanur M., Mizan R., Park H., Byun K.-H., Lee N., Park S.H., Ha S.-D. Genetic relationship, virulence factors, drug resistance profile and biofilm formation ability of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from mussel // Front. Microbiol. — 2019. — Vol. 10. — P. 513–526.
12. Brooun A., Liu S., Lewis K. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. — 2000. — Vol. 44(3). — P. 640–646.
13. Cisneros-Montemayor A.M., Pauly D., Weatherdon L.V., Ota Y. A globale estimate of seafood consumption by coastal indigenous peoples // PLoS ONE. — 2016. — Vol. 11(12). — e0166681.
14. Fagerquist K.C., Zaragoz J.W. Bacteriophage cell lysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* for top-down proteomic identification of Shiga toxins 1 & 2 using matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry // Rapid Commun. Mass Spectrom. — 2016. — Vol. 30(6) — P. 671–680.
15. Ferreira L., Sánchez-Juanes F., González-Ávila M., Cembreiro-Fuciños D., Herrero-Hernández A., González-Buitrago J.M., Muñoz-Bellido J.L. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry // J. Clin. Microbiol. — 2010. — Vol. 48(6). — P. 2110–2115.
16. Gagnaire J., Dauwalder O., Boisset S., Khau D., Freydière A.-M., Ader F., Bes M., Lina G., Tristan A., Reverdy M.-E., Marchand A., Geissmann T., Benito Y., Durand G., Charrier J.-P., Etienne J., Welker M., Van Belkum A., Vandenesch F. Detection of delta-toxin production by whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry // PLoS ONE. — 2012. — Vol. 7(7). — e40660.
17. Kuhns M., Zautner A.E., Rabsch W., Zimmermann O., Weig M., Bader O, Groß U. Rapid discrimination of *Salmonella enterica* serovar Typhi from other serovars by MALDI-

- TOF mass spectrometry // PLoS ONE. — 2012. — Vol. 7(6). — e40004.
18. Kull S., Pauly D., Stormann B., Kirchner S., Stommler M., Dorner B.D., Lasch P., Naumann D, Dorner B.G. Multiplex detection of microbial and plant toxins by immunoaffinity enrichment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // Anal. Chem. — 2010. — Vol. 82(7). — P. 2910–2924.
 19. Lee K.K., Liu P.C., Huang C.Y. *Vibrio parahaemolyticus* infectious for both humans and edible mollusk abalone // Microbes Infect. — 2003. — Vol. 5(6). — P. 481–485.
 20. Lin C., Yu R.C., Chou C.C. Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to various environmental stresses after cold shock treatment // Int. J. Food Microbiol. — 2004. — Vol. 92. — P. 207–215.
 21. Park A.J., Murphy K., Krieger J.R., Brewer D., Taylor P., Habash M., Khursigara C.M. A temporal examination of the planktonic and biofilm proteome of whole cell *Pseudomonas aeruginosa* PA O1 using quantitative mass spectrometry // Mol. Cell. Proteomics. — 2014. — Vol. 13(4). — P. 1095–1105.
 22. Park K.S., Ono T., Rokuda M., Jang M.H., Okada K., Iida T., Honda T. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus* // Infect Immun. — 2004. — Vol. 72(11). — P. 6659–6665.
 23. Reyhanath P.V., Kutty R. Incidence of multidrug resistant *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Ponnani, South India // Iran. J. Microbiol. — 2014. — Vol. 6(2). — P. 60–64.
 24. Song X., Ma Y., Fu J., Zhao A., Guo Z., Malakar P.K., PanabcY., Zhao Y. Effect of temperature on pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* biofilm formation // Food Control. — 2017. — Vol. 73. — P. 485–491.
 25. Thomas D.P., Bachmann S.P., Lopez-Ribot J.L. Proteomics for the analysis of the *Candida albicans* biofilm lifestyle // Proteomics. — 2006. — Vol. 6(21). — P. 5795–5804.
- биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова 2018; 14(4):27–32 (in Russian).
5. Rykovskaya OA. Molekulyarno-biologicheskaya kharakteristika i sovershenstvovaniye identifikatsii i differentsiatsii *Vibrio parahaemolyticus* i *Vibrio alginolyticus*: dis ... kand biol nauk. Rostov-na-Donu: Rostovskiy-na-Donu protivochumnyy institut Rospotrebnadzora, 2016: 153 (in Russian).
 6. Skitovich GS, Shadrova NB, Pruntova OV. *Vibrio parahaemolyticus*: rasprostraneniye, vyyavleniye i metody identifikatsii. Veterinariya segodnya 2015; 3(14):66–70 (in Russian).
 7. Tarasenko TT, Kosenok YeV, Krivonogova VA, Sheverdina FN. Zabolevayemost' prokhimi kishhechnymi infektsiyami v Primorskom kraye. Zdorov'ye. Meditsinskaya ekologiya. Nauka 2016; 3(66):127–134 (in Russian).
 8. Titova SV, Verkina LM. Modelirovaniye bioplenok kholemnogo vibriona na tverdykh poverkhnostyakh (steklo i plastik) i vizualizatsiya ikh v svetovom i lyuminiscentnom mikroskopakh. Klinicheskaya i laboratornaya diagnostika 2016; 61. 4:238–241 (in Russian).
 9. Shvarts TA. Bioplenki kak mikrobnoye soobshchestvo. Vestnik Kurganskogo gosudarstvennogo universiteta 2015; 7(1):41–44 (in Russian).
 10. Allegrucci M, Hu FZ, Shen K, Hayes J, Ehrlich GD, Post JC, Sauer K. Phenotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* biofilm development. J Bacteriol 2006; 188(7):2325–2335.
 11. Ashrafudoulla M, Furkanur M, Mizan R, Park H, Byun K-H, Lee N, Park SH, Ha S-D. Genetic relationship, virulence factors, drug resistance profile and biofilm formation ability of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from mussel. Front Microbiol 2019; 10:513–526.
 12. Brooun A, Liu S, Lewis K. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2000; 44(3):640–646.
 13. Cisneros-Montemayor AM, Pauly D, Weatherdon LV, Ota Y. A globale estimate of seafood consumption by coastal indigenous peoples. PLoS ONE 2016; 11(12):e0166681.
 14. Fagerquist KC, Zaragoz JW. Bacteriophage cell lysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* for top-down proteomic identification of Shiga toxins 1 & 2 using matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 2016; 30(6):671–680.
 15. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Ávila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2010; 48(6):2110–2115.
 16. Gagnaire J, Dauwalder O, Boisset S, Khau D, Freydière A-M, Ader F, Bes M, Lina G, Tristan A, Reverdy M-E, Marchand A, Geissmann T, Benito Y, Durand G, Charrier J-P, Etienne J, Welker M, Van Belkum A, Vandenesch F. Detection of delta-toxin production by whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. PLoS ONE 2012; 7(7):e40660.
 17. Kuhns M, Zautner AE, Rabsch W, Zimmermann O, Weig M, Bader O, Groß U. Rapid discrimination of *Salmonella*

References

1. Beleneva IA, Maslennikova EF, Magarlamov TYu. Fiziologo-biokhimicheskiye svoystva galofil'nykh vibrirov *Vibrio parahaemolyticus* i *V. alginolyticus*, izolirovannykh iz gidrobiontov zaliva Petra Velikogo Yaponskogo morya. Biologiya morya 2004; 30(2):114–119 (in Russian).
2. Bocharova YuA, Chebotar' IV, Mayanskiy NA. Vozmozhnosti, problemy i perspektivy mass-spektrometricheskikh tekhnologiy v meditsinskoy mikrobiologii (obzor literatury). Klin lab diagnostika 2016; 61(4):249–256. (in Russian).
3. Lominadze GG, Semenova YeA, Motuzova OV, Kalakutskaya AN, Lazareva AV. Ispol'zovaniye metoda MALDI-TOF mass-spektrometrii dlya uskoreniya identifikatsii mikroorganizmov v gemokul'turakh patsiyentov s podozreniyem na sepsis. Laboratoriya LPU 2014; 4:17–20 (in Russian).
4. Poleyeva MV, Chemisova OS, Pisanov RV, Tsyurulina OA. Cposob polucheniya preparata pryamogo termostabil'nogo gemolizina (TDH) *Vibrio parahaemolyticus*. Vestnik

- enterica* serovar Typhi from other serovars by MALDI-TOF mass spectrometry. PLoS ONE 2012; 7(6):e40004.
18. Kull S, Pauly D, Stormann B, Kirchner S, Stommler M, Dorner BD, Lasch P, Naumann D, Dorner BG. Multiplex detection of microbial and plant toxins by immunoaffinity enrichment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Anal. Chem 2010; 82(7):2910–2924.
 19. Lee KK, Liu PC, Huang CY. *Vibrio parahaemolyticus* infectious for both humans and edible mollusk abalone. Microbes Infect 2003; 5(6):481–485.
 20. Lin C, Yu RC, Chou CC. Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to various environmental stresses after cold shock treatment. Int J Food Microbiol 2004; 92:207–215.
 21. Park AJ, Murphy K, Krieger JR, Brewer D, Taylor P, Habash M, Khursigara CM. A temporal examination of the planktonic and biofilm proteome of whole cell *Pseudomonas aeruginosa* PA O1 using quantitative mass spectrometry. Mol Cell Proteomics 2014; 13(4):1095–1105.
 22. Park KS, Ono T, Rokuda M, Jang MH, Okada K, Iida T, Honda T. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect Immun 2004; 72(11):6659–6665.
 23. Reyhanath PV, Kutty R. Incidence of multidrug resistant *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Ponnani, South India. Iran J Microbiol 2014; 6(2):60–64.
 24. Song X, Ma Y, Fu J, Zhao A, Guo Z, Malakar PK, Panabcy Y, Zhao Y. Effect of temperature on pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* biofilm formation. Food Control 2017; 73:485–491.
 25. Thomas DP, Bachmann SP, Lopez-Ribot JL. Proteomics for the analysis of the *Candida albicans* biofilm lifestyle. Proteomics 2006; 6(21):5795–5804.

MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY METHOD FOR STUDY BIOFILMS OF PARAHEMOLYTIC VIBRIOS

O.S. CHEMISOVA, M.V. POLEEVA

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

Vibrio parahaemolyticus is opportunistic halophilic microorganism, inhabitant of sea water and isolated from various seafood. Seafood contaminated by *V. parahaemolyticus* are a common cause of human illness, acute gastroenteritis. The bacteria ability to form biofilms leads to multiple drug resistance, which is a potential threat to human health. The MALDI-TOF mass spectrometry method can be used not only for identification of microorganisms, but also for intraspecific typing. The purpose of the work is to study the possibility of using the MALDI-TOF mass spectrometry method for identification of *V. parahaemolyticus* biofilms and comparative characteristics of mass-spectra of «plankton» and «biofilm» forms on different biotic substrates. It is shown that during the transition of *V. parahaemolyticus* strains from «planktonic» to «biofilm» form, changes in phenotypic properties, including mass spectra, are observed, which affects the reliability of vibrios identification by MALDI-TOF mass spectrometry. Species identification of strains is possible only after bacteriological cultivation.

Keywords: MALDI-TOF mass spectrometry; *Vibrio parahaemolyticus*; biofilm; substrate; composite correlation index; composite correlation index matrix; dendrogram.

Address:

Chemisova O.S., Ph.D.

Acting Deputy Director for Research, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don

E-mail: chemisova@inbox.ru

Для цитирования:

О.С. Чемисова, М.В. Полеева. Метод MALDI-TOF масс-спектрометрии для изучения биопленок параземолитических вибрионов. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(1):40–47.

For citation:

O.S. Chemisova, M.V. Poleeva. MALDI-TOF mass spectrometry method for study biofilms of parahemolytic vibrios. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(1):40–47 (in Russian).

ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛИТОВ *TRICHODERMA SPP.* В СОСТАВЕ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕГО СРЕДСТВА ДЛЯ ВЕТЕРИНАРИИ

И.А. ГНЕУШЕВА, И.Ю. СОЛОХИНА*, Н.Е. ПАВЛОВСКАЯ, Н.Ю. АГЕЕВА

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

В статье приведены исследования по применению биологически активных пептидных метаболитов (БАПМ) *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в составе ранозаживляющего линимента 3% с Na-карбоксиметилцеллюлозой (Na-КМЦ), пантенолом и карбополом для животных. Показано, что при применении в лечении инфицированных ран экспериментальных крыс-самцов линимента с БАПМ *Trichoderma atrobrunneum* 3% на основе Na-КМЦ можно рекомендовать данную формулирующую основу для практического применения в ветеринарной практике. Проводя исследование микробиоценоза раны экспериментальных животных при развитии гнойно-воспалительного процесса в инфицированной ране, установлено, что линимент с БАПМ *Trichoderma atrobrunneum* 3% на основе Na-КМЦ обладает бактериостатическим эффектом в отношении *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. В ходе гистологического исследования у крыс наблюдали наибольшую интенсивность формирования соединительнотканых структур кожи в процессе заживления раны с линиментом БАПМ *Trichoderma atrobrunneum* 3% на основе Na-КМЦ.

Ключевые слова: линимент, *Trichoderma atrobrunneum*, биологически активные пептидные метаболиты.

Введение

Плесневые грибы рода *Trichoderma* spp. являются эффективными продуцентами вторичных метаболитов — соединений, продуцируемых самим организмом, но не участвующих в росте, развитии или репродукции [14], и представляют интерес для растениеводства, фармацевтической промышленности в качестве компонента биопрепаратов для лечения заболеваний растений и животных [8, 14].

Некоторые вторичные метаболиты гриба оказывают выраженное антимикробное действие, благодаря чему перспективны для использования в качестве источников новых лекарственных антибактериальных препаратов [16]. Получение антибиотических соединений грибами *Trichoderma* spp. было впервые описано Вайндлингом [24].

Метаболитами, обладающими антибактериальной активностью, являются летучие (например, этилен, водо-

родцианиды, спирты, монотерпены, альдегиды и кетоны с длиной цепи до C₄) и нелетучие (например, пептаиболы и дикетопиперазин, такие как глиотоксин и глиовирин) соединения [20, 22].

Грибы *Trichoderma* spp. способны синтезировать биологически активные нерибосомальные пептиды с антимикробной активностью, такие как циклоспорины, пептаиболы, интерес к которым резко возрос в последнее время в связи с перспективами их использования для разработки лекарственных препаратов нового поколения [1, 4, 12]. Эти пептиды рассматривают в качестве молекул-кандидатов, с помощью которых можно преодолеть устойчивость к антибиотикам у патогенных микроорганизмов, вирусов и раковых клеток [15].

Пептаиболы с различной биологической активностью синтезируются грибами рода *Trichoderma* [21]. Так, пептаиболы — трихоконины, образуемые штаммом *T. pseudokoningii* SMF2, индуцируют обширный апоптоз у фитопатогенного микроорганизма *Fusarium oxysporum*. Трихоспорины В-VIIa и В-VIIb, продуцируемые *T. polysporum*, проявляют антитрипаносомиазную активность в отношении *Trypanosoma brucei brucei*. Активно изучают применение в фармации трихозеанина (продуцент *T. artroviride*) (Hermosa et al., 2014) [10, 11] и сузуказилина А (продуцент *T. viride* штамм 63 C-I), подавляющих метициллинрезистентные бактерии [6].

© 2021 г. Гнеушева И.А., Солохина И.Ю., Павловская Н.Е., Агеева Н.Ю.

* Автор для переписки:

Солохина Ирина Юрьевна

канд. биол. наук, доцент кафедры биотехнологии, ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина»

E-mail: solohinairina@yandex.ru

Сейчас метаболиты *Trichoderma* spp. чаще всего используются в биоконтроле фитопатогенов сельскохозяйственных растений [7, 13]. Так, *Trichoderma harzianum* наиболее часто используется в биоконтроле зерновых, овощных, плодовых и плантационных культур [2, 9, 18]. Классические механизмы биоконтроля фитопатогенов включают в себя антибиоз, микопаразитизм и конкуренцию за питательные вещества [5].

Trichoderma harzianum — гриб, хорошо известный своей способностью продуцировать широкий спектр вторичных метаболитов, антибиотиков и гидролитических ферментов (хитиназы, целлюлазы, β -1,3-глюканазы и ксиланазы), разрушающих клеточную стенку (CWDE) фитопатогенных грибов. В настоящее время описано множество штаммов *Trichoderma harzianum*, которые обладают полезными свойствами в борьбе с болезнями растений [19]. Однако информации об антимикробной активности метаболитов отдельных изолятов *Trichoderma* в отношении условно-патогенных и патогенных бактерий, в том числе энтеробактерий человека и животных, очень мало [23].

Поэтому поиск продуцентов антимикробных соединений среди представителей рода *Trichoderma* и исследование их биологических свойств в составе биопродукции защитно-стимулирующего действия является одним из перспективных направлений в создании новых антимикробных средств, например, для ветеринарной практики.

Актуальной проблемой современной ветеринарной фармации представляется создание новых лекарственных средств для лечения раневых повреждений животных различного генеза для достижения наиболее благоприятного регенераторного процесса. В связи с этим нами была рассмотрена возможность применения биологически активных пептидных метаболитов *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434, полученных по оригинальной методике в составе ранозаживляющего средства раневых повреждений экспериментальных животных, обеспечивающего эффективное течение репаративной регенерации.

Материалы и методы

Объектом исследования служил штамм *Trichoderma atrobrunneum*, выделенный из почвы Московской области (Россия) в 2014 году Александровой А.В. и депонированный в 2018 году во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИгенетика (Россия) под номером

ВКПМ F-1434. Данный штамм является подвидом *Trichoderma harzianum* [3].

При проведении идентификации штамма методом ПЦР-амплификации были использованы следующие праймеры (Druzhinina et al., 2008) [7]: EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3'), TEF1-LLErev (5'-AACTTGCAGGCAATGTGG-3'). Филогенетический маркер, используемый для идентификации, — Tef1_int4.

Этот штамм обладает стабильными культурально-морфологическими признаками при пассажах, как правило, характеризуется более высокой антибиотической активностью, скоростью роста и продуктивностью образования спор и биомассы. Штамм поддерживается в коллекции научного центра «Орловский региональный центр сельскохозяйственной биотехнологии» (г. Орел, Россия). Штамм синтезирует биологически активные соединения, обладающие антигрибной и антибактериальной активностью, в том числе и в отношении патогенной микрофлоры [17].

Тест-объектами для оценивания антимикробных свойств в исследовании являлись штаммы *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Характеристика микробных культур: штамм *P. aeruginosa* характеризовался наличием гемолитической и фибринолитической активностью; в отличие от него, штамм *S. aureus* проявлял гемолитическую и лецитиназную активность.

Получение биологически активных пептидных метаболитов *T. atrobrunneum* ВКПМ-1434 (БАПМ *Tr. atr.*) проводили по оригинальной методике (Гнеушева и др., 2019) [17].

Определение молекулярных масс соединений в активной фракции БАПМ *Tr. atr.* проводили на масс-спектрометре Ultraflex II MALDI ToF/ToF «BrukerDaltonics» (Германия), оснащённом УФ лазером 355 нм (Nd) в режиме получения положительных ионов с использованием рефлектрона. На мишени смешивали по 1 мкл раствора образца и 0,3 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты с концентрацией 10 мг/мл в 20%-ном ацетонитриле с 0,5%-ной трифторуксусной кислотой и полученную смесь высушивали на воздухе. Точность измеренных молекулярных масс соединений во фракции составляла 0,001 %.

Результаты измерения концентрации пептидных веществ в БАПМ проводили на наноспектрофотометре Nanodrop 2000 (ДИА-М) при диапазоне длин волн 408–275 нм.

Определение острой токсичности и основных токсикологических параметров БАПМ осуществляли по методу Кербера. Работа проводилась на 56 белых мышах обоего пола с массой тела 16–20 г. Содержание животных осуществляли в соответствии с «Правилами лабораторной практики (GLP)» и Приказа МЗ РФ № 708Н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Лабораторные животные, соответствующие требованиям для включения в эксперимент, разделялись на группы с учетом пола, возраста, массы и принципа рандомизации. Экспериментальную работу проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г.), «Правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных» (Страсбург, 1986). Протокол исследования согласован с комитетом по этике ФКП «Орловская биофабрика» (г. Орел, Россия) (№ 14 от 06.08.2019).

Определение острой токсичности, а также вычисление LD_{50} по методу Кербера на белых мышах осуществлялось при однократном внутривенном введении ультрафильтрата в группах по 8 особей в диапазоне доз: от 3000 до 6000 мг/кг. Все испытуемые дозы ультрафильтрата растворяли в дистиллированной воде до необходимого объема, составляющего 1,0 мл / 100 г массы животного.

В заявляемом препарате выбор содержания активного вещества по показателям его биодоступности проводился экспериментальным путем на кроликах породы шиншилла, разбитых на 8 групп по 8 экспериментальных животных.

На предварительно лишенный волос и скарифицированный участок кожи на спине кролика размером 5 см² наносили различные концентрации ультрафильтрата в интервале от 0,5 до 12,0 мас. % активного вещества из расчета 0,2 мл на 1 см². На шею кролика надевали специальный воротник, препятствующий слизыванию препарата. Через 30–40 мин проводили осмотр участка кожи для определения наличия местного раздражающего эффекта (зуд, покраснение, ожог). Тщательно протирали обработанный участок дистиллированной водой и под наркозом вырезали участок кожи с эпидермальным слоем размером 1 см², который гомогенизировали ультразвуком для экстракции активного вещества со 100 мл дистиллированной воды в течение 30 мин. Полученный раствор фильтровали через стерилизующий фильтр типа «Сарториус» и спектрофотометрически определяли концентрацию активного вещества при длине волны 275 нм. Следующий осмотр животного проводили через 24 ч.

Методика исследования ранозаживляющей активности исследуемых биологически активных пептидных

метаболитов проводилась на крысах-самцах (Лепский, 2006). В модельных экспериментах использовали инбредных крыс-самцов (масса тела 150–200 г) линии WKY (Wistar – Kyoto), полученных из питомника лабораторных животных «Пушино» (Россия).

Длительность акклиматизационного периода для всех животных составила не менее 14 дней. В течение карантина проводили ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние), животных наблюдали в клетках (заболеваемость и смертность). Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы. Животные, не соответствующие критериям, были исключены из исследования в течение карантина. В экспериментальные группы были отобраны животные без признаков отклонений внешнего вида.

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с правилами, утвержденными ГОСТ Р 53434-2009 г., по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально биологических клиник (вивариев) (Каркищенко, 2007; ГОСТ Р 53434, 2009 г.). Световой режим составлял 12 часов света и 12 часов темноты. Температура воздуха поддерживалась в пределах 18–22 °С, относительная влажность — 50–70%. После этого осуществляли исследование в пяти группах по 8 экспериментальных животных.

Схема эксперимента приведена в таблице 1. Предварительно были подобраны соотношения компонентов каждого ранозаживляющего линимента для проведения эксперимента.

Таблица 1

Схема эксперимента на лабораторных крысах

Номер группы	Количество животных	Доза, г/животное
1 — контроль	8	нет
2 — опыт — линимент синтомицина 5%	8	1,0
3 — опыт — линимент с биологически активными соединениями <i>T. atrobrunneum</i> 3% с Na-КМЦ	8	1,0
4 — опыт — линимент с биологически активными соединениями биологически активных пептидных метаболитов 3% с пантенолом	8	1,0
5 — опыт — линимент биологически активные соединения биологически активных пептидных метаболитов 0,8% с карбополом	8	1,0

В составе линимента синтомицина 5% 100 г содержится в качестве действующего вещества 5 г синтомицина, а в качестве вспомогательных веществ — 20 г масла касторового, 7 г эмульгатора №1, 0,6 г натрия-карбоксиметилцеллюлозы очищенной, 0,2 г кислоты сорбиновой, воды очищенной — до 100 г.

Животных ежедневно осматривали, определяли состояние и размер раны. На 7-, 14- и 28-е сутки раны тотально вырезали вместе с участком здоровой кожи и подвергали гистологическому исследованию.

Исследуемые препараты наносили на кожу (на область раны) в течение 14 дней, один раз в день в указанных дозах. После нанесения препаратов животные помещались в индивидуальные метаболические клетки на 1 час для предотвращения слизывания препаратов. Индукция патологии (оперативное вмешательство по нанесению ран) осуществлялась под наркозом. В качестве анестезирующего вещества использовали «Золетил 100» — диссоциативный анестетик, разрешенный к применению на территории Российской Федерации.

Для нанесения линейных ран шерсть на дорсальной поверхности животных выстригалась вдоль позвоночника на ширину 20 мм и длину 40 мм. Рана наносилась по шаблону при помощи скальпеля посередине выстриженного участка на длину 50 ± 2 мм до собственной фасции. Глубина — примерно 2–3 мм. Затем на равном расстоянии накладывались 2 шва (нить капроновая с фторполимерным покрытием — Фторлин, Линтекс), сближающие края раны и обеспечивающие регенерацию раны от краев к центру. Для удобства последующего измерения размеров ран швы накладываются с таким расчетом, чтобы эпителий боковых краев раны не соприкасался и эпителизация происходила от конечных краев раны.

Инфицирование раны проводили через 72 часа после альтерации. Для этого под образовавшийся струп вводили микробную взвесь *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* в соотношении 1:1 при КОЕ 4×10^8 кл/мл.

Бактериоскопический метод исследования использовали для определения микрофлоры гнойного очага. У выделенных культур определялись факторы патогенности: плазмокоагулаза, лецитиназа, гемолизин, фибринолизин по общепринятым методикам.

Тест на лецитиназу проводили на желточном агаре (пептон — 20 г, гидрофосфат натрия — 2,5 г, натрий — 1 г, 0,5%-ный раствор сульфата магния — 0,1 мл, глюкоза — 1 г, агар — 12,5 г, вода дистиллированная — 500 мл, рН 7,2–7,4; после стерилизации вносили один стерильный желток на 500 мл среды). Исследуемую

культуру засеивали дробно, культивировали при 37–38 °С 24–48 ч. Положительный результат — появление зоны помутнения вокруг колоний.

Тест на гемолизин проводили путем засева исследуемой культуры уколом или дробно в чашки Петри с 5%-ным кровяным агаром. Посевы инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Гемолизин, выделяемый растущей культурой бактерий, диффундирует в толщу агара и вызывает лизис эритроцитов, что проявляется в виде светлой (β -гемолиз) или полупрозрачной (α -гемолиз) зоны вокруг колоний.

Тест на плазмокоагулазу. Петлю бактериальной массы исследуемой культуры, снятой с поверхности агаровой среды, смешивали с 0,5 мл плазмы крови кролика (или человека), не разведенной или разведенной стерильным физиологическим раствором в соотношении 1:4, инкубировали при 37 °С, результаты учитывали через 4 и 24 ч. Положительная реакция — образование сгустка.

Тест на фибринолизин. Исследуемую культуру микроорганизма засеивали в виде «бляшки» на агар с 12% цитрированной плазмы. Посевы инкубировали при 37 °С 23–24 ч. Положительный результат — появление зоны просветления вокруг колонии

Гистологическое изучение образцов кожи кролика осуществлялось непосредственно после эвтаназии экспериментального животного, вырезался лоскут кожи 1 см на 2 см (с захватом пораженного и здорового участка), который помещался в фиксирующую жидкость (10% нейтральный забуференный формалин) на 72 часа. После промывки под проточной водой в течение 24 часов проводилось обезвоживание образца в изопропиловом спирте с последующим пропитыванием обезвоженного образца парафином и заливкой в парафин с 6% воском. С парафиновых блоков делались срезы толщиной 6–10 мкм, окрашивались гематоксилином и эозином для выявления типовых гистологических характеристик патологических изменений различных структур кожи с помощью световой микроскопии.

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программного пакета Excel Microsoft XP 7 для Windows 2000. Для полученных данных рассчитывали среднее значение и ошибки отклонения.

Результаты и обсуждение

Технология получения биологически активного ультрафильтрата *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434. Получение биологически активных пептидных метаболитов *T. atrobrunneum* осуществляли следующим обра-

зом. Для приготовления инокулята недельную агаровую культуру *T. atrobrunneum* ВКПМ-1434 суспендировали в физрастворе до мутности 1,5 McF, засеяли на жидкую питательную среду Чапека в соотношении 1:10, инкубировали 5 суток на качалке при температуре 28 °С. Продуцент культивировали в лабораторном ферментере Minifors производства Infors (Германия) объемом 5 л с коэффициентом заполнения 0,8. Ферментер оснащен лопастью мешалкой, фильтрами тонкой очистки воздуха, датчиками температуры и рН. Питательную среду готовили непосредственно в аппарате. Среда для глубинного культивирования состояла из 0,2% натрия азотнокислого, 0,1% калия фосфата однозамещенного, 0,05% магния сернокислого гептагидрата, 0,05% калия хлористого, 0,001% железа сернокислого на 1 литр воды (w/v). Простерилизовав, устанавливали рН 7,4 и асептически вносили стерильный концентрат сахарозы. Вводили инокулят в количестве 0,5% объема среды, инкубировали 5 суток при 28,0 °С, перемешивая с частотой оборотов 120 мин⁻¹.

Культуральную жидкость последовательно фильтровали через марлю и бумажный фильтр, центрифугировали 10 минут с ускорением 10000 g, супернатант отделяли и фильтровали через мембраны «Владипор» типа

МФА-МА (ТУ6-05-1903-87). Фильтрат соединяли с гидрофобным растворителем 1:1 и перемешивали 3 часа, отстаивали до разделения слоев и отбирали неполярную фракцию, которую упаривали досуха при 40 °С. Осадок восстанавливали в 5 мл 60% раствора этанола. В спиртовом растворе препарат представляет собой маслянистую жидкость оранжевого цвета, при стоянии в холоде оседает в виде капель, при взбалтывании переходит в эмульсию. Растворим в этилацетате, ацетоне, ацетонитриле. Рабочий раствор имеет желтый оттенок, прозрачен и/или слегка опалесцирует. При УФ-спектрометрии определяется максимум поглощения на длине волны 275 нм. После тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе хлороформ:метанол (3:1) определяется $R_f=0,44$.

С целью сохранения, концентрирования целевых БАПМ и удаления балластных соединений был применен метод ультрафильтрации с целью фракционирования этилацетатного экстракта по молекулярным массам. В качестве разделяющего порога при помощи нейтральных мембран из полиэфирсульфона (PES) UltraSep™ были выбраны размеры пор 5,0–50,0 мкм.

Масс-спектр анализ ультрафильтрата показал, что фракции ультрафильтрата характеризуется наличием 7 пептидов (рис. 1).

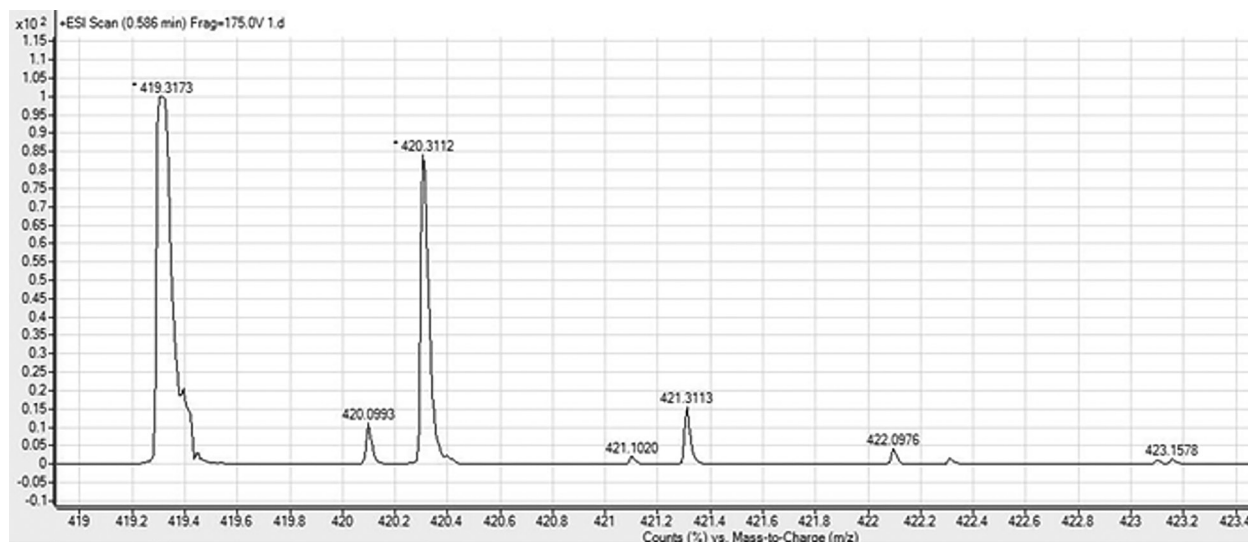


Рис. 1. Пептидный профиль среднемолекулярной фракции ультрафильтрата биологически активных соединений *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434

Качественные биохимические реакции (биуретовая, Фоля) показали положительные результаты, в связи с чем можно сделать вывод о пептидной природе метаболитов и серосодержащей аминокислоты (цистин, цистеин) в составе пептидов.

Определение острой токсичности и основных токсикологических параметров БАПМ *Tr. atr.* Для

оценки токсичности исследуемых БАПМ в течение первых суток после введения наблюдали поведение белых мышей, их активность, потребление пищи и воды, рассматривали общее состояние экспериментальных животных, характер клинических проявлений интоксикации, возможный летальный исход и морфологические изменения внутренних органов (табл. 2).

Определение острой токсичности (среднесмертельной дозы) ультрафильтрата (по Керберу)

	Доза ультрафильтрата, мг/кг						
	3000	3500	4000	4500	5000	5500	6000
Выжило мышей	8	8	8	8	6	3	2
Погибло мышей	0	0	0	0	2	5	6
Z	0	0	0	0	1,0	3,5	5,5
D	500	500	500	500	500	500	500
Z×D	0	0	0	0	500	1750	2750
	$\Sigma(Z \cdot D) = 5000$						

Примечание: D — интервал между двумя смежными дозами; Z — среднее арифметическое из двух значений числа тест-объектов, у которых проявился положительный эффект при воздействии каждой из двух смежных доз; n — число тест-объектов в группе. $LD_{50} = LD_{100} - (Z \cdot D) / n$. $LD_{50} = 6000 - 5000 / 8 = 6000 - 625 = 5375$ мг/кг. LD_{50} исследуемого ультрафильтрата составляет 5375 мг/кг

Результаты проведенных исследований острой токсичности изучаемых биологически активных пептидных метаболитов позволяют отнести данные соединения к относительно безвредным веществам по действующей классификации на основании использования метода Кербера. Исходя из этого, руководствуясь классификацией Л.И. Медведь, Ю.С. Кагана, Е.И. Спыну (1968), принятой в настоящее время ВОЗ, исследованное нами средство на данном этапе можно отнести к группе малотоксичных веществ и в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности» по степени токсичности — к 4-му классу опасности как вещества малоопасные.

При введении группам изучаемых белых мышей БАПМ в дозах 3000, 3500, 4000, 4500 мг/кг общее состояние животных в данных группах не страдало, они оставались активными, сохраняли аппетит. При введении в дозе 5000 мг/кг отмечалось незначительное снижение активности у трех мышей из 8 через 4 часа после введения исследуемого микробного средства; в дальнейшем признаки интоксикации не росли, два животных отказались от приема корма и в дальнейшем через 12 часов погибли.

При введении биологически активных пептидных метаболитов группам экспериментальных животных в дозах 5500–6000 мг/кг состояние мышей нарушалось в более ранние сроки — через 3 часа: отмечалось ограничение подвижности, вялость, слабая реакция на внешние раздражители, отказ от приема корма, животные предпочитали сидеть группами рядом с водой. Через два часа после введения белым мышам исследуемого средства у животных движения стали скованными, мыши лежали с

закрытыми глазами. Через три часа животные из названных групп были полностью неподвижны. Участились акты дефекации, по истечении 5 часов после введения их помет потерял каловый характер: стал водянистым с большим количеством слизи. Гибель животных наблюдалась на 6- и 7-й час после введения. Погибли соответственно 5 и 6 животных.

Погибших экспериментальных животных вскрывали и исследовали органы микроскопически: наблюдались гемодинамические нарушения в виде полнокровия сосудов с явлениями стаза в легких, печени, почек, головном мозге. Миокард, эпикард не имели видимых изменений. Легкие полнокровны, отечные. Печень обычных размеров, полнокровна, паренхима рыхлая. Слизистая желудка гиперемирована, в просвете слизь. Кишечник заполнен слизью, почки полнокровны, корковый слой дифференцируется. Головной мозг серого цвета, полнокровен. Гибель животных при остром отравлении наступила в результате сердечно-легочной недостаточности.

Условия создания линимента ранозаживляющего на основе БАПМ *Tr. atr.* Для лечения инфицированных ран экспериментальных животных готовили лекарственную форму — линименты ранозаживляющие, содержащие в своем составе БАПМ *T. atrobrunneum* ВКПМФ-1434. В качестве формообразующей основы линимента использовали 3% натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ), 3% декспантенол, 0,8% карбопол. Данные концентрации были получены опытным путем. Результаты выбора содержания исследуемых БАПМ по характеру воздействия на кожу экспериментального животного приведены в таблице 3.

Таблица 3

**Выбор содержания БАПМ по характеру воздействия на кожу экспериментального животного
в линименте с 3% Na-карбоксиметилцеллюлозой**

Концентрация БАПМ в препарате, мас. %	Характер воздействия на кожу кролика	Сохранение стерильности в течение 7 дней	Примечание: годность для лечения
0,5	Кожа после обработки раствором без видимых изменений в течение 24 часов	Стерилен	Препарат пригоден для лечения
1,0	Кожа после обработки раствором без видимых изменений в течение 24 часов	Стерилен	Препарат пригоден для лечения
3,0	Кожа после обработки раствором без видимых изменений в течение 24 часов	Стерилен	Препарат пригоден для лечения
5,0	Повышенная чувствительность через 1 час после обработки к внешнему воздействию. Шелушение кожи в месте обработки через 24 часа	Стерилен	Препарат не пригоден для лечения
7,0	Сильное покраснение через 1 час обработки. Кролики беспокоятся и пытаются лизать место обработки в течение 15 минут. Сильное шелушение кожи через 24 часа	Стерилен	Препарат не пригоден для лечения
10,0	Сильное покраснение через 1 час обработки. Кролики беспокоятся и пытаются лизать место обработки в течение 30 минут. Сильное шелушение кожи через 24 часа	Стерилен	Препарат не пригоден для лечения
12,0	Сильное раздражение кожи с последующей гиперемией	Стерилен	Препарат противопоказан для лечения

Проведенные исследования показали, что при концентрации БАПМ в линименте с Na-КМЦ в пределах 0,5–3,0 мас. % препарат не раздражает кожу и хорошо переносится животными. При увеличении концентрации выше 3,0 мас. % препарат раздражает и сенсibiliзирует кожу и такой состав не пригоден для наружного применения. Аналогичные данные были получены по выбору содержания БАПМ в линименте с 3% декспантенолом, 0,8% карбополом.

Таким образом, оптимальным соотношением компонентов для решения поставленной задачи в ранозаживляющем, противовоспалительном и противомикробном лекарственном препарате является следующее эффективное содержание БАПМ *T. atr.* – 0,5–3,0 мас. %.

В операцию подготовки формообразующих основ входил процесс растворения и набухания, а также установления заданного показателя рН. В производственной емкости соединяют рассчитанное количество очищенной воды и навеску основы, перемешивали с помощью механической мешалки до однородного состояния. Основу стерилизовали 10 минут автоклавированием при 1 атм.

120 °С, охлаждали до 45 °С. Полученную основу асептически нагружали БАПМ, тщательно перемешивали и оставляли в течение суток при температуре 2–8 °С до полного завершения структурообразования. Готовые формы линимента разливают во флаконы-дозаторы. Наличие или отсутствие микробной контаминации открытых флаконов с препаратом определяли в течение семи дней хранения при комнатной температуре методом мембранной фильтрации в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи, XI издание, выпуск 2, стр. 187.

Исследование показало сохранность биологической активности и полное отсутствие контаминации исследуемых линиментов гнилостными бактериями и грибами при хранении.

Биодоступность линимента ранозаживляющего на основе БАПМ *T. atr.* Полученные экспериментальные данные, представленные в таблице 4, показывают, что биодоступность более 50% получена при концентрации активного вещества в линименте с формообразующей основой 3% Na-карбоксиметилцеллюлозой в интервале от 3,0 до 10,0 мас. %.

Биодоступность БАПМ в составе линимента с 3% Na-КМЦ

Концентрация БАПМ в препарате, масс. %	Концентрация БАПМ в препарате, мг	Концентрация БАПМ в эпидермисе через 30 мин, мг	Биодоступность, %	Показатели качества лекарственной формы
0,5	0,1	0,034±0,86	34,0 (низкая)	Однородный, прозрачный, умеренно вязкий раствор (пригоден к применению)
1,0	0,2	0,097±0,36	48,5 (низкая)	Однородный, прозрачный, умеренно вязкий раствор (пригоден к применению)
3,0	0,6	0,34±1,12	56,6 (высокая)	Однородный, прозрачный, умеренно вязкий раствор (пригоден к применению)
5,0	1,0	0,62±0,87	62,0 (высокая)	Однородный, прозрачный, умеренно вязкий раствор (пригоден к применению)
7,0	1,4	0,99±0,65	70,7 (высокая)	Однородный, прозрачный, умеренно вязкий раствор (пригоден к применению)
10,0	2,0	1,09±0,85	77,8 (высокая)	Однородный, прозрачный, умеренно вязкий раствор (пригоден к применению)
12,0	2,4	1,14±1,02	47,5 (низкая)	Осадок (не пригоден к применению)

При концентрации активного вещества менее 3,0 мас. % биодоступность составляет менее 50% и недостаточна для эффективного лечения глубоких ран. При концентрации более 12,0 мас. % активное вещество не полностью растворяется в формирующихся основах, образуя осадок. При попытке дальнейшего растворения активного вещества при нагреве, после охлаждения до комнатной температуры происходит его частичная кристаллизация при хранении, и данный состав является непригодным для применения.

Таким образом, 3,0 мас. % активного вещества БАПМ *Tr. atr.* в виде ультрафильтра рекомендуется во включение в состав линимента ранозаживляющего

при лечении инфицированных ран животных. Данное содержание активного компонента не вызывает на коже животного видимых изменений (раздражений, сухости, гиперемий и т.д.).

Эффективность лечебного действия инфицированной раны исследуемыми линиментами на основе БАПМ *Tr. atr.* С целью выявления возможных системных побочных эффектов при применении исследуемых линиментов оценивали массу тела экспериментальных животных в двух точках эксперимента: до начала нанесения средств (4-е сутки от инфицирования ран) и после окончания нанесения (14-е сутки) перед эвтаназией. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5

Динамика массы тела крыс-самцов в процессе лечения линиментами ранозаживляющими, г, $M \pm m$, $n=9$

Группа животных	Сутки эксперимента	
	4	14
1 – контрольная (без лечения)	344 ±1,2	385±1,14
2 – опытная (лечение линиментом синтомицина 5%)	347±0,58	370±0,98
3 – опытная (линимент БАПМ <i>T. atr.</i> 3% с Na-КМЦ)	344±0,21	400±1,23
4 – опытная (линимент БАС БАПМ 3% с пантенолом)	346±0,14	398±1,28
5 – опытная (линимент БАС БАПМ 0,8% с карбополом)	344±1,14	384±0,99

Поскольку в ходе эксперимента не происходило резкого снижения массы тела, можно косвенно судить об отсутствии системных побочных эффектов данного препарата.

В дальнейшем исследовании, при первичном внедрении исследуемых тест-объектов в ткань наблюдали развитие воспалительной реакции, которая завершалась через 96 часов (4-е сутки) от начала инфицирования

формированием первичного гнойно-воспалительного очага. Именно в этот период и начинали лечение раны, наносили линименты. В этот период отмечается выход в очаг воспаления медиаторов, таких как клеточных и плазменных медиаторов, биогенных аминов, активных белков. Учитывали размеры раны, данные представлены в таблице 6.

Результаты анализа инфицирования ран у крыс-самцов

Группа животных	Средний размер инфицированной раны в сутки, см ²				
	4	7	14	21	28
1 — контрольная (без лечения)	12,4±0,32	7,4±0,65	3,5±0,54	1,8±0,36	0,65±0,58
2 — опытная (лечение линиментом синтомицина 5%)	12,2±0,21	5,9±0,25	3,4±0,58	0,8±0,41	0
3 — опытная (линимент БАПМ <i>T. atr.</i> 3% с Na-КМЦ)	12,6±1,02	6,4±0,37	1,8±0,09	0	0
4 — опытная (линимент БАС БАПМ 3% с пантенолом)	13,5±0,25	7,3±1,05	2,1±0,35	0	0
5 — опытная (линимент БАС БАПМ 0,8% с карбополом)	12,1±0,36	7,4±1,06	2,2±0,38	0	0

В контрольной группе экспериментальных животных на месте инфицированной раны сразу после нанесения линиментов БАПМ *T. atr.* со всеми рассматриваемыми формообразующими основами образовывался участок сухого коагуляционного некроза, четко отграниченного от окружающей здоровой ткани. Через 3-е суток от начала лечения вокруг этой зоны создавалась демаркационная линия поврежденного эпидермиса размером 3–4 мм. Начиная со 2-х суток на поверхности ран возникала фибриновая пленка, которая утолщалась и становилась более темной в течение первой недели.

В последующие 7 суток лечения ран по периферии раны наблюдалась гиперемия и образовывался воспалительный валик. При этом размеры очага поражения значительно уменьшались. К 14-м суткам от начала лечения очаг сокращался за счет врастания в него с периферии эпидермиса в виде языков. К 28-м суткам в опытных вариантах инфицированные раны полностью заживлялись, чего нельзя сказать о контрольном варианте (без лечения).

Во 2-й группе кроликов заживление инфицированных ран при лечении линиментом 5% синтомицина происходило в более короткие сроки, чем в 1-й группе (без лечения), однако в течение всего срока лечения было значительно выражено местное воспаление. Форма ран менялась за счет неравномерного врастания эпидермиса. К 21-му дню раны полностью эпителизовались с краев, а к 28-му дню заживали на всей экспериментальной площади.

В 3–5 группах были отмечены лучшие результаты. В течение первых семи дней наблюдалась интенсивная местная воспалительная реакция, однако уже на 14-е сутки воспаление полностью исчезало и инфицированные раны эпителизовались за счет наплыва регенерирующего эпителия с краев. Полное сращивание эпителия при заживлении раны наступало во всех вариантах лечения БАПМ на 21-й день, что на 7 дней раньше, чем во 2-й группе, и на две недели раньше, чем в контрольной группе.

При применении в лечении инфицированных ран экспериментальных животных линиментом с БАПМ *T. atr.* 3% на основе Na-КМЦ на 14-е сутки от начала лечения размер инфицированной раны был на 14% меньше, чем при использовании БАПМ на основе декспантенола и карбопола, и на 43% меньше, чем при использовании линимента синтомицина 5%. Таким образом, есть основание рекомендовать данную формообразующую основу для практического применения с БАПМ в ветеринарной практике.

Изучение микробиоценоза раны при развитии гнойно-воспалительного процесса в инфицированной ране и при лечении исследуемыми линиментами ранозаживляющими на основе БАПМ *Tr. atr.* Экспериментальные исследования, выполненные на лабораторных крысах-самцах, позволили проследить динамику изменения концентрации исследуемых тест-объектов в ране в процессе развития инфекции при спонтанном процессе и при лечении исследуемыми линиментами (табл. 7).

Динамика изменения концентрации суммы микроорганизмов, 10^5 кл/см³

Периоды инфекционного процесса	Концентрация микроорганизмов, сумма микроорганизмов, 10^5 кл/см ³				
	контрольная (без лечения)	опытная (лечение линиментом синтомицина 5%)	опытная (линимент БАПМ <i>T. atr.</i> 3% с Na-КМЦ)	опытная (линимент БАС БАПМ 3% с пантенолом)	опытная (линимент БАС БАПМ 0,8% с карбополом)
Инфицирование раны — 4-е сутки до лечения	104±1,05	102±0,98	104±0,54	102±0,87	104±0,36
Формирование первичного очага инфекции — 7-е сутки лечения	98,7±0,36	86,5±1,02	75,4±1,05	79,8±0,84	76,4±1,04
I фаза — стадия гидратации. Формирование гнойного экссудата — 9-е сутки лечения	98,1±0,12	74,3±0,58	69,7±0,84	68,7±0,65	69,9±0,51
I фаза — стадия гидратации. Период активной экссудации — 14-е сутки лечения	89,5±0,38	68,4±0,98	65,8±0,87	65,9±0,87	66,1±1,1
II фаза — стадия гидратации. Завершение экссудации — 21-е сутки лечения	85,4±0,65	38,4±1,02	37,2±0,49	37,9±0,65	37,4±0,58
II фаза — стадия регенерации и пролиферации — 28-е сутки лечения	45,7±0,87	0,3	0,1	0,3	0,3

Значительные изменения в количественном содержании исследуемых условно-патогенных тест-организмов в инфицированных ранах при лечении ранозаживляющими линиментами отмечались во II стадии гидратации, когда происходит изменение кровообращения в очаге воспаления, выход жидкой части крови и лейкоцитов в очаг воспаления. Уровень микробной обсемененности гнойного очага при лечении ранозаживляющими линиментами в этот период снизился на 62,3–64%. Надо сказать, что в это время наблюдается изменение доминирующего положения у ассоциантов в микробиоценозе. Если в I фазе стадии гидратации доминирует *P. aeruginosa*, его КОЕ в 9 раз больше, чем *S. aureus*, то в качестве лидирующего

инфектанта в период завершения стадии гидратации происходит снижение концентрации *Pseudomonas aeruginosa* и возрастание *S. aureus*, а затем, на стадии регенерации происходит восстановление исходного баланса исследуемых тест-объектов в биоценозе раны. БАПМ *Tr. atr.* проявляют бактериостатический эффект.

В дальнейшем проведено изучение динамики изменения факторов патогенности при развитии инфекционного процесса и лечении исследуемыми ранозаживляющими линиментами (табл. 8). Факторы патогенности — это материальные носители, обуславливающие способность микробов вызывать инфекционный процесс.

Изменение факторов патогенности в процессе развития инфекционного процесса на фоне лечения исследуемыми линиментами ранозаживляющими на основе БАПМ *Tr. atr.*

Период инфекционного процесса	Инфицирующие агенты	Факторы патогенности			
		лецитиназа	гемолизины	плазмокоагулаза	фибринолизины
Инфицирование раны	<i>P. aeruginosa</i> ,	+	+	-	-
	<i>S. aureus</i>	-	+	-	+
Воспалительный очаг	<i>P. aeruginosa</i> ,	+	+	-	-
	<i>S. aureus</i>	-	+	-	+
Экссудация	<i>P. aeruginosa</i> ,	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	+	+	-	-
Пролиферация	<i>P. aeruginosa</i> ,	-	-	+	-
	<i>S. aureus</i>	+	-	+	+

В экспериментальных исследованиях установлено изменение факторов патогенности в течение развития инфекционного процесса в ране при лечении ранозаживляющими линиментами на основе БАПМ *Tr. atr.* В период инфицирования, а также при формировании воспалительного очага изменение факторов патогенности не отмечалось.

В стадии экссудации, при лидирующем положении в ране *P. aeruginosa* прекращает продуцировать все изначально имеющиеся у него факторы патогенности. В отличие от него, *S. aureus* продолжает синтезировать как гемолизины, так и лецитиназу, которые, по-видимому, обеспечивают ему возможность занять свою экологическую нишу в ране и тем самым сохраниться в структуре микробиоценоза, хотя и в ингибирующем состоянии.

В период заживления раны не удается продуцировать фибринолизин *P. aeruginosa*, хотя он восстанавливает свою гемолитическую активность. В отличие от него, *S.*

aureus, кроме изначально продуцирующей лецитиназы, также начинает синтезировать фибринолизин и плазмокоагулазу. И этот набор факторов патогенности инфектанты сохраняют до конца эксперимента. Таким образом, подбирая препарат для этиотропной терапии, необходимо иметь в виду, что микробный возбудитель, который в данный период времени течения раневой инфекции не является лидирующим, но при дальнейшем развитии гнойной инфекции раны станет определять исход заболевания.

Гистология инфицированных ран на фоне применения линиментов ранозаживляющих на основе БАПМ *Tr. atr.* В ходе гистологического исследования во всех группах экспериментальных животных в зоне дефекта наблюдалось наличие тонкого слоя эпидермиса с выраженной складчатостью в области повреждения. Визуализировались клетки эпидермиса с крупными гиперхромными ядрами, хорошо выраженными ядрышками (рис. 2).

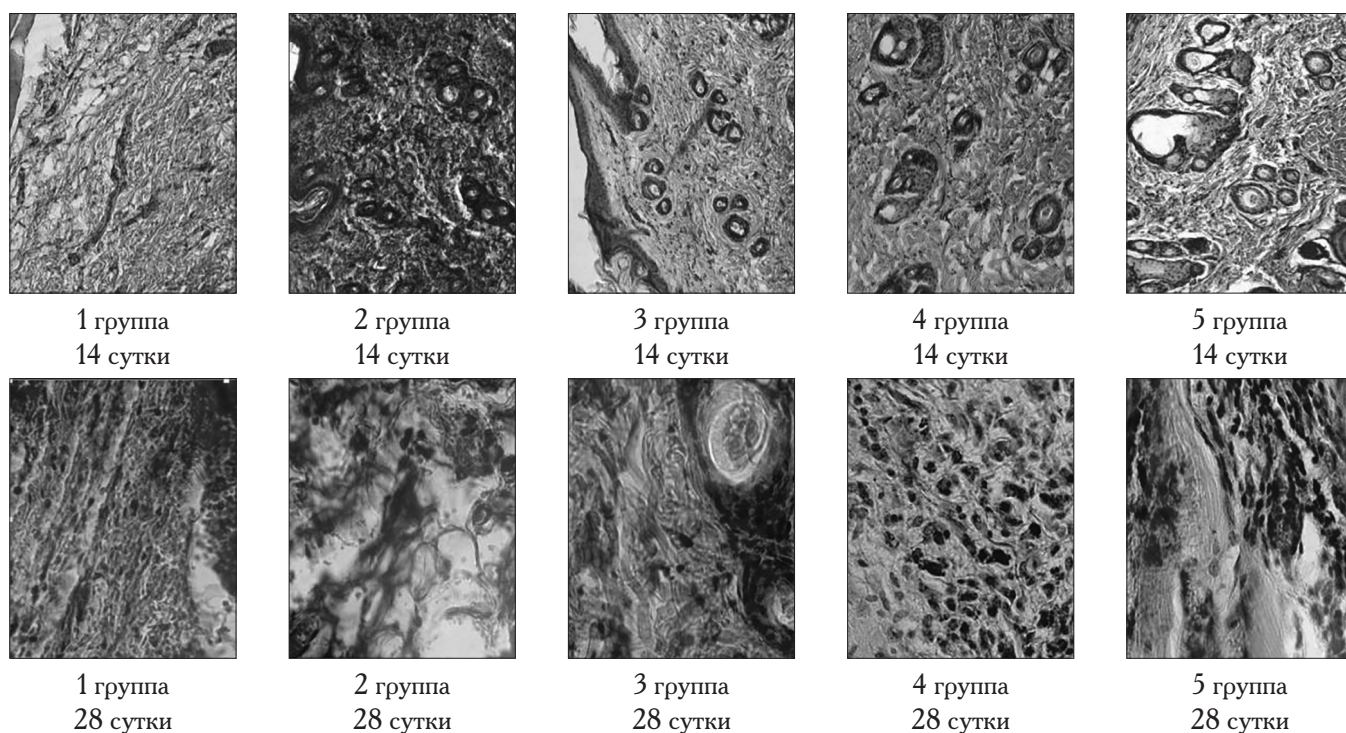


Рис. 2. Общий план: эпидермис, дерма, верхняя граница гиподермы крыс на 14- и 28-е сутки

Во всех группах в гиподерме визуализировались кровенаполненные сосуды и единичные периваскулярные лимфоидно-лимфоцитарные инфильтраты. Среди клеточных элементов обнаруживаются фибробласты, другие клетки крови и соединительной ткани. В целом гистологическая картина полностью соответствует заживлению кожи после хирургического разреза.

В экспериментальных группах животных имелись различия в интенсивности формирования рыхлой со-

единительной ткани, что характеризовалось толщиной и плотностью волокнистых структур и свидетельствует о различном влиянии исследуемых линиментов по отношению к фибробластам, а также о расположении и плотности клеточных элементов.

Наибольшей интенсивностью формирования соединительнотканых структур характеризуется кожа крыс 3-й группы, которым применялся препарат — БАПМ *T. atr.* 3% с Na-КМЦ. В дерме также отмечена

гиперплазия потовых желез. На втором месте по интенсивности формирования соединительнотканых структур находится кожа от крыс 2-й группы (лечение линиментом синтомицина 5%), далее — крыс 5-й группы (линимент БАС БАПМ 0,8% с карбополом), потом следует кожа животных 4-й группы (линимент БАС БАПМ 3% с пантенолом) и, наконец, самой низкой интенсивностью формирования характеризуется кожа животных 1-й группы (без лечения). Кроме того, в коже животных, которым применялся только линимент БАС БАПМ 3%, обнаруживается низкая плотность клеточных элементов в эпидерме.

Заключение

Таким образом, биологически активные пептидные метаболиты *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в составе ранозаживляющего линимента проявляют бактериостатическую активность в отношении *P. aeruginosa*, *S. aureus*, высокую ранозаживляющую, противовоспалительную эффективность и сокращают сроки лечения инфицированных ран и могут быть использованы в ветеринарной практике в составе биопродукции защитно-стимулирующего действия.

Литература

1. Abid A., Vacha N., Ahmad B. et al. Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites // Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. — 2014. — Vol. 4. — No. 11. — P. 859–870.
2. Benitez T., Rincon A.M., Limon M.C. and Codon A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains // International Microbiology. — 2004. — Vol. 7. — P. 249–260.
3. Bissett J., Gams W., Jaklitsch W. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015 // IMA FUNGUS. — 2015. — Vol. 6(2). — P. 263–295.
4. Brakhage A. Regulation of fungal secondary metabolism // Nature Reviews Microbiology. — 2013. — Vol. 11(1). — P. 21–32.
5. Chet I. *Trichoderma*: Application, Mode of Action and Potential as Biocontrol Agent of Soilborne Plant Pathogenic Fungi / In Chet I. (Ed.), Innovative Approaches to Plant Disease Control. — John Wiley & Sons, New York, 1987. — P. 137–160.
6. Daniel J.F. and Filho E.R. Peptaibols of *Trichoderma* // Natural Product Reports. — 2007. — Vol. 24. — P. 1128–1141.
7. Druzhinina I.S., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B.A., Kenerley C.M., Monte E., Mukherjee P.K., Zeilinger S., Grigoriev I.V., Kubicek C.P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success // Nature Reviews Microbiology. — 2011. — Vol. 9. — P. 749–759.
8. Fox E.M., Howlett B.J. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology // Current Opinion in Microbiology. — 2008. — Vol. 11. — P. 481–487.
9. Harman G.E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. // Phytopathology. — 2006. — Vol. 96. — P. 190–194.
10. Hermosa R., Cardoza R.E., Rubio M.B., Gutiérrez S., Monte E. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma* // The open Mycology Journal. — 2014. — Vol. 8. — P. 127–139.
11. Hermosa R., Cardoza R., Rubio M., et al. Chapter 10 — Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma* / In: Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. — Elsevier, 2014. — P. 125–137.
12. Holt A., Killian J.A. Orientation and dynamics of transmembrane peptides: the power of simple models // Eur. Biophys. J. — 2010. — Vol. 39. — P. 609–621.
13. Howell C.R. *The Role of Antibiosis in Biocontrol* / In: Harman G.E. and Kubicek C.P. (Eds.). *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, Biological Control, and Commercial Applications. — Taylor & Francis, London, 1998. — P. 173–184.
14. Kubicek C.P., Harman G.E. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Volume 1: Basic Biology, Taxonomy and Genetics (1st ed.). — CRC Press, 1998. — P. 3–12.
15. Kuvarina A.E., Kurakov A.V., Sadykova V.S., Gromovych T.I. Non-ribosomal peptides of fungi: biological activity and their prospects in medicine // Problems of Medical Mycology. — 2016. — Vol. 18. — No. 3. — P. 36–41.
16. Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010 // Journal of Natural Products. — 2012. — Vol. 75(3). — P. 311–335.
17. Patent — 2710783 RF, C12N 1/14, C12Q 1/04, C12R 1/645. *Trichoderma atrobrunneum* strain with antibacterial activity against *Bacillus anthracis*. N.E. Pavlovskaya, I.A. Gneusheva, A.V. Lushnikov, O.A. Markina. Federal State Budgetary Institution of Higher Professional Education «Oryol State Agrarian University». №. 2019102438; Applicat. 29.01.2019; Publ. 13.01.2020, Bul. № 2. — 7 p.
18. Pavlovskaya N., Gneusheva I., Solokhina I. and Ageeva N. The biological activity of subspecies *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*, the causative agent of fusarium wilt cucumber in vitro // BIO Web of Conferences 21, 00021 (2020). Published online: 22 June 2020. doi: 10.1051/bioconf/20202100021.
19. Saksirirak W., Chareerak P. and Bunyatrachata W. Induced systemic resistance of biocontrol fungus, *Trichoderma* spp. against bacterial and ray leaf spot in tomatoes // As. J. Food Ag-Ind., — 2009. — Special Issue.— P. 99–104.

20. Sivasithamparam K. and Ghisalberti E.L. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium* / In Harman G.E. and Kubicek C.P. (Eds.). *Trichoderma and Gliocladium*. – Taylor & Francis, London, 1998. – P. 139–149.
21. Stoppacher N., Neumann N.K.N., Burgstaller L. et al. The comprehensive peptaibiotics database // Chem. Biodiv. – 2013. – Vol. 10(5). – P. 734–743.
22. Szekeres A., Leitgeb B., Kredics L., Antal Z., Hatvani L., Manczinger L. and Vagvolgyi C. Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*. A review // Acta Microbiol. Immunol. Hungary. – 2005. – Vol. 52(2). – P. 137–168.
23. Phupiewkham Weerawa, Sirithorn Pisan, Saksirirat Weerasak and Thammasirirak Sompong. Antibacterial agents from *Trichoderma harzianum* strain T9 against pathogenic bacteria // Chiang Mai J. Sci. – 2015. – Vol. 42(2). – P. 304–316.
24. Weindling R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi // Phytopathology, – 1934. – Vol. 24. – P. 1153–1179.
12. Holt A, Killian JA. Orientation and dynamics of transmembrane peptides: the power of simple models. Eur Biophys J 2010; 39. – P. 609–621.
13. Howell CR. The Role of Antibiosis in Biocontrol. In: Harman GE and Kubicek CP, (Eds), *Trichoderma and Gliocladium*, Vol 2. Enzymes, Biological Control, and Commercial Applications. Taylor & Francis, London, 1998: 173–184.
14. Kubicek CP, Harman GE. *Trichoderma and Gliocladium*. Volume 1: Basic Biology, Taxonomy and Genetics (1st ed). CRC Press, 1998: 3–12.
15. Kuvarina AE, Kurakov AV, Sadykova VS, Gromovykh TI. Non-ribosomal peptides of fungi: biological activity and their prospects in medicine. Problems of Medical Mycology 2016; 18(3):36–41.
16. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. Journal of Natural Products 2012; 75(3):311–335.
17. Paten 2710;83 RF, C12N 1/14, C12Q 1/04, C12R 1/645. *Trichoderma atrobrunneum* strain with antibacterial activity against *Bacillus anthracis*. NE Pavlovskaya, IA Gneusheva, AV Lushnikov, OA Markina. Federal State Budgetary Institution of Higher Professional Education «Oryol State Agrarian University». № 2019102438; Applicat 29.01.2019; Publ 13.01.2020, Bul № 2. 7 p.
18. Pavlovskaya N, Gneusheva I, Solokhina I and Ageeva N. The biological activity of subspecies *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*, the causative agent of fusarium wilt cucumber in vitro. BIO Web of Conferences 21, 00021 (2020). Published online: 22 June 2020. doi: 10.1051/bioconf/20202100021.
19. Saksirirat W, Chareerak P and Bunyatrachata W. Induced systemic resistance of biocontrol fungus, *Trichoderma* spp against bacterial and ray leaf spot in tomatoes. As J Food Ag-Ind 2009: Special Issue: 99–104.
20. Sivasithamparam K and Ghisalberti EL. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In Harman GE and Kubicek CP (Eds). *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor & Francis, London, 1998: 139–149.
21. Stoppacher N, Neumann NKN, Burgstaller L et al. The comprehensive peptaibiotics database. Chem Biodiv 2013; 10(5):734–743.
22. Szekeres A, Leitgeb B, Kredics L, Antal Z, Hatvani L, Manczinger L and Vagvolgyi C. Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*. A review. Acta Microbiol Immunol Hungary 2005; 52(2):137–168.
23. Phupiewkham Weerawa, Sirithorn Pisan, Saksirirat Weerasak and Thammasirirak Sompong. Antibacterial agents from *Trichoderma harzianum* strain T9 against pathogenic bacteria. Chiang Mai J Sci 2015; 42(2):304–316.
24. Weindling R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. Phytopathology, 1934; 24:1153–1179.

References

1. Abid A, Bacha N, Ahmad B et al. Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2014; 4(11):859–870.
2. Benitez T, Rincon AM, Limon MC and Codon AC. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology 2004; 7:249–260.
3. Bissett J, Gams W, Jaklitsch W. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. IMA FUNGUS 2015; 6(2):263–295.
4. Brakhage A. Regulation of fungal secondary metabolism. Nature Reviews Microbiology 2013; 11(1):21–32.
5. Chet I. *Trichoderma*: Application, Mode of Action and Potential as Biocontrol Agent of Soilborne Plant Pathogenic Fungi. In Chet I (Ed), Innovative Approaches to Plant Disease Control. John Wiley & Sons, New York, 1987: 137–160.
6. Daniel JF and Filho ER. Peptaibols of *Trichoderma*. Natural Product Reports 2007; 24:1128–1141.
7. Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, Mukherjee PK, Zeilinger S, Grigoriev IV, Kubicek CP. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. Nature Reviews Microbiology 2011; 9:749–759.
8. Fox EM, Howlett BJ. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. Current Opinion in Microbiology 2008; 11:481–487.
9. Harman GE. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 2006; 96:190–194.
10. Hermosa R, Cardoza RE, Rubio MB, Gutiérrez S, Monte E. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. The open Mycology Journal 2014; 8:127–139.
11. Hermosa R, Cardoza R, Rubio M, et al. Chapter 10 – Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of

JUSTIFICATION OF THE POSSIBILITY OF USING *TRICHODERMA* SPP. METABOLITES AS PART OF A WOUND HEALING AGENT FOR VETERINARY MEDICINE

I.A. GNEUSHEVA, I.Yu. SOLOKHINA, N.E. PAVLOVSKAYA, N.Yu. AGEEVA

Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhin, Orel

The article presents studies on the use of biologically active peptide metabolites of *Trichoderma atrobrunneum* VKPM F-1434 in the composition of wound-healing liniment 3% Na-CMC (Na-carboxymethylcellulose), panthenol and carbopol for animals. It is shown that when using the liniment with *Trichoderma atrobrunneum* 3% based on Na-CMC in the treatment of infected wounds of experimental male rats, this formative basis can be recommended for practical use in veterinary practice. Conducting a study of the microbiocenosis of the wound of experimental animals with the development of a purulent-inflammatory process in an infected wound, it was found that the liniment with *Trichoderma atrobrunneum* 3% ВАРМ based on Na-CMC has a bacteriostatic effect

Keywords: liniment, *Trichoderma atrobrunneum*, biologically active peptide metabolites.

Address:

Solokhina I.Yu., Ph.D.

associate professor of the Department of Biotechnology,

Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhin, Orel

E-mail: solohinairina@yandex.ru

Для цитирования:

И.А. Гнеушева, И.Ю. Солохина, Н.Е. Павловская, Н.Ю. Агеева. Обоснование возможности применения метаболитов *Trichoderma* spp. в составе ранозаживляющего средства для ветеринарии. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2021; 17(1):48–61.

For citation:

I.A. Gneusheva, I.Yu. Solokhina, N.E. Pavlovskaya, N.Yu. Ageeva. Justification of the possibility of using *Trichoderma* spp. metabolites as part of a wound healing agent for veterinary medicine. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2021; 17(1):48–61 (in Russian).

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ БЕШЕНСТВА ЖИВОТНЫХ

В.А. ЛОБАНОВА*, В.И. КЛЮКИНА

Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, поселок Биокомбината, Московская область

В обзоре проанализирована литература о разработке и усовершенствовании как уже одобренных Международным эпизоотическим бюро (МЭБ), так и альтернативных методов выявления антител к вирусу бешенства в биологических жидкостях животных. Использовались источники из баз данных электронных библиотек e-library и PubMed и др. Сейчас ведутся работы по усовершенствованию рекомендуемых МЭБ методов определения вирус-нейтрализующих антител (RFFIT и FAVN). Разработан ряд различных вариантов иммуноферментного анализа, а также предложены методы определения антирабических вирус-нейтрализующих антител в образцах низкого качества, в том числе гемолитической торакальной жидкости. Помимо широко применяемых, предлагаются альтернативные методы определения антител к вирусу бешенства, предусматривающие как качественное определение протективного титра антител к вирусу (например, с помощью тест-полосок), так и количественное определение титров с использованием таких высокоточных методов, как проточная цитометрия.

Ключевые слова: бешенство, прижизненная диагностика, выявление антител, реакция вирус-нейтрализации, иммуноферментный анализ.

Введение

Бешенство (греч. «rabies» — безумие) — острое природно-очаговое заболевание теплокровных животных и человека, характеризующееся поражениями нервной системы и 100% летальным исходом [45]. Ежегодно от бешенства умирают почти 59000 человек во всем мире. Распространение бешенства собак является прямой угрозой появлению случаев бешенства людей в регионе, поэтому бешенство по-прежнему представляет собой глобальную угрозу. Согласно данным ВОЗ, в России за 2010—2017 гг. зарегистрирован 51 случай смерти людей от лабораторно подтвержденного бешенства [14].

Российская Федерация на протяжении многих лет является неблагополучной по бешенству животных. Подавляющее большинство случаев бешенства выявляют у домашних и диких плотоядных: кошек, собак, енотовидных собак, лис, куниц. Основным направлением профилактики бешенства на протяжении многих лет остается вакцинация домашних и диких животных [1]. Неотъемлемым компо-

нентом контроля эффективности вакцинопрофилактики служит определение титров антител к вирусу бешенства в сыворотках крови вакцинированных животных.

Цель данного обзорного исследования состояла в анализе литературы, посвященной разработке и усовершенствованию как уже одобренных Международным эпизоотическим бюро (МЭБ), так и альтернативных методов выявления антител к вирусу бешенства в биологических жидкостях животных. Для анализа использовались источники, доступные в базах данных электронных библиотек e-library и PubMed, а также материалы Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных международного эпизоотического бюро [45].

Общепризнанные методы выявления антител к вирусу бешенства

Для оценки иммунного ответа у вакцинированных домашних животных, в том числе для международной транспортировки, МЭБ апробированы методы нейтрализации вируса в культурах клеток (КК), а для мониторинга эффективности кампаний массовой вакцинации одобрен ряд тест-систем на основе иммуноферментного анализа [45].

Определение титра антирабических вирус-нейтрализующих антител (ВНА) в реакции нейтрализации вируса на белых мышах не является рекомендуемым МЭБ методом с 2008 г. [44], однако нередко выступает

© 2021 г. Лобанова В.А., Ключкина В.И.

* Автор для переписки:

Лобанова Варвара Андреевна
аспирант отдела иммунологии Всероссийского научно-исследовательского и технологического института биологической промышленности (ФГБНУ ВНИТИБП)

E-mail: varvara.ustinoval995@gmail.com

в качестве референс-метода при оценке диагностической ценности новых тест-систем, а также используется в производстве для оценки титров ВНА в диагностических и референс-сыворотках [18, 27, 35, 52].

Тест быстрого ингибирования фокусов флуоресценции — Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT). Метод определения вирус-нейтрализующих антител к вирусу бешенства (ВБ) в сыворотке крови *in vitro* в тесте быстрого подавления фокусов флуоресценции (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test, RFFIT) впервые был предложен Smith et al. в 1973 году [53]. Титр ВНА в реакции RFFIT определяется по разведению сыворотки, при добавлении которой к штамму CVS-11 вируса бешенства при последующей инокуляции культуры клеток (КК) ВНК-21 наблюдают уменьшение количества полей с флуоресцирующими клетками на 50% или более по сравнению с контролем.

Минимальный титр ВНА, необходимый для международной транспортировки животных, составляет 0,5 МЕ/мл [7, 60]. Этот же стандарт применяется к собакам и кошкам для подтверждения формирования протективного титра антител после вакцинации [7].

Тест нейтрализации вируса флуоресцентными антителами — Fluorescent Antibody Virus Neutralization (FAVN) test. Тест нейтрализации вируса флуоресцентными антителами (Fluorescent Antibody Virus Neutralization test, FAVN), предложенный Cliquet et al. в 1998 году [28], является адаптацией теста RFFIT [53]. Принцип методов FAVN и RFFIT одинаков, однако методология проведения тестов существенно отличается (табл. 1); при этом тесты дают эквивалентные результаты о титрах ВНА к вирусу бешенства в исследуемых сыворотках [28].

Таблица 1

Особенности проведения RFFIT и FAVN

Основные этапы проведения теста	RFFIT	FAVN
Положительная контрольная сыворотка	Эталонный стандарт ВОЗ или МЭБ сыворотки или стандарт лаборатории, соответствующий эталонному, 2,0 МЕ/мл. Положительный контрольный стандарт, 0,5 МЕ/мл	Признанный МЭБ эталонный стандарт сыворотки крови собак, 0,5 МЕ/мл
Отрицательная контрольная сыворотка	Стандарт сыворотки с активностью <0,1 МЕ/мл	Сыворотки от невакцинированных собак
Разведения тестируемой сыворотки (исследуемый объем — 0,1 мл)	Скрининговое тестирование (в т.ч. для стандартной оценки эффективности вакцинации): 1/5, 1/50. Конечное определение титра антител: 1/5, 1/25, 1/125, 1/625	Не менее четырех трехкратных последовательных разведений: 1/3, 1/9, 1/27, 1/81, 1/243 и т.д.
Вирус для заражения КК	Вирус бешенства штамма CVS-11	
Доза вируса	50 FFD ₅₀ /0,1 мл ⁽¹⁾	100 TCID ₅₀ /50 мкл ⁽²⁾
Инкубирование вируса с сывороткой	При 37 °С во влажном инкубаторе с 0,5% CO ₂ в течение 90 минут	При 35–37 °С во влажном инкубаторе с 5% CO ₂ в течение 1 часа
Культура клеток (КК)	КК мышшиной нейробластомы мыши (MNA) или аналогичная клеточная линия (CCL-131)	КК почки сирийского хомячка ВНК-21
Инкубирование с КК	При 35 °С во влажном инкубаторе с 0,5% CO ₂ , 20 часов	При 35–37 °С во влажном инкубаторе с 5% CO ₂ , 48 часов
Фиксация образцов	В 80% холодном ацетоне (-20 °С) при комнатной температуре	
Окрашивание	ФИТЦ-конъюгированными антирабическими антителами	
Учет результатов	Подсчитывают количество полей (20 на лунку), где наблюдают флуоресценцию конъюгата	Качественная оценка общей поверхности каждой лунки на наличие флуоресценции
Определение ВНА в сыворотке	Титр ВНА — фактор максимального разведения сыворотки, при котором в 50% микроскопических полей наблюдают уменьшение вирусного инокулята на 97%)	Титр ВНА сыворотки (D ₅₀) рассчитывают с помощью неопробитографического метода или по формуле Спирмена — Кербера [59] ⁽³⁾
	Титр ВНА в МЕ/мл рассчитывают путем сравнения с титром положительной стандартной сыворотки.	

Примечания: ⁽¹⁾ — FFD₅₀ — фокус-формирующая доза. 1 FFD₅₀ — разведение, при котором 50% наблюдаемых микроскопических полей содержат один или несколько очагов инфицированных клеток. Исходная суспензия вируса должна содержать не менее 1×10⁴ FFD₅₀ на 0,1 мл. ⁽²⁾ — TCID₅₀ — доза вируса, инфицирующая 50% культуры клеток. ⁽³⁾ — Формула для перевода титра сыворотки в активность в МЕ/мл:

$$\text{Титр сыворотки (МЕ/мл)} = \frac{10^{(\log D_{50} \text{ сыворотки})} \times \text{теоретический титр положительной стандартной сыворотки } 0,5 \text{ МЕ/мл}}{10^{(\log D_{50} \text{ положительной стандартной сыворотки } 0,5 \text{ МЕ/мл})}}$$

Титр ВНА в сыворотке крови в тесте FAVN определяется как разведение сыворотки, при котором в 50% лунок нейтрализуется 100% вируса. Однозначность учета результатов для каждой лунки планшета и связанная с этим возможность простого и быстрого расчета титра антител в исследуемой сыворотке способствовали широкому применению данного метода для определения уровня поствакцинальных ВНА у домашних [13, 39] и диких животных [43], а также для оценки эффективности разрабатываемых вакцин [12, 22].

В случае исследования образцов плохого качества (сывороток, экстрактов мышц, торакальной жидкости) может наблюдаться цитотоксический эффект (ЦТЭ), что не позволяет корректно интерпретировать результаты FAVN. Для решения этой проблемы Т. Bedekovic et al. в 2013 г. предложили удалять инокулят из лунок планшета через 1 час после его добавления, тем самым предотвращая проявление ЦТЭ образцов на культуру клеток и обеспечивая возможность использования образцов экстрактов мышц и торакальной жидкости для оценки эффективности кампаний оральной вакцинации [25]. Они протестировали с помощью стандартного и модифицированного таким образом FAVN (mFAVN) образцы сывороток крови, экстрактов мышц и торакальной жидкости собак и доказали высокую специфичность и чувствительность mFAVN при полном отсутствии ЦТЭ образцов на культуру клеток. Следует отметить, что в классическом тесте FAVN из-за цитотоксичности образцов авторам не удалось интерпретировать результаты 1,9% образцов сывороток, 34,3% — экстрактов мышц и 54,9% — торакальной жидкости.

Иммуноферментный анализ. Иммуноферментный анализ (ИФА, ELISA) — это серологический

экспресс-метод, не требующий работы с живым вирусом бешенства и позволяющий выявлять антитела как к цельному вирусу, так и к его отдельным белкам: глико- и нуклеопротеину. Ни один из доступных методов ИФА не одобрен МЭБ для определения титров антител к вирусу бешенства при оформлении документов для международной транспортировки и торговли животными, однако ИФА широко применяют для оценки поствакцинального иммунитета у отдельных животных и эффективности кампаний вакцинации в целом [45].

Между методами вирус-нейтрализации и иммуноферментного анализа наблюдается сильная, но не строгая корреляция титров антител. В отличие от RFFIT и FAVN, качество результатов ИФА не зависит от качества исследуемой сыворотки, однако чувствительность и специфичность данного метода зависят от особенностей проведения теста.

Способ определения антител к гликопротеину вируса бешенства методом твердофазного непрямого ИФА был предложен F. Cliquet et al. [31] в 2000 г. как адаптация метода P. Atanasiu & P. Perrin, 1979 г. [24]. На данный момент разработан широкий спектр тест-систем на основе непрямого ИФА для выявления антител к цельному вирусу бешенства или его белкам в сыворотках крови различных видов животных (табл. 2). При этом в части тест-систем используются специфические антивидовые пероксидазные конъюгаты, а в части — конъюгированный с пероксидазой хрена протеин *A Staphylococcus aureus*, дающий возможность выявлять антитела различных видов животных и, таким образом, позволяющий исследовать сыворотки разных видов животных с помощью одной тест-системы.

Таблица 2

Методы выявления антител к вирусу бешенства на основе ИФА

Автор метода, коммерческий набор	Материал для исследования	Антиген	Пероксидазный конъюгат	Источник
Твердофазный непрямо́й ИФА				
F. Cliquet et al., 2000 (адаптация метода P. Atanasiu & P. Perrin, 1979)	Сыворотка крови собак и лис	Гликопротеин вируса бешенства	Кроличьи антитела к IgG собаки	[24, 30, 31]
F. Cliquet et al., 2004 <i>Serelisa TM Rabies Ab mono Indirect</i>	Сыворотка крови собак и кошек	Инактивированный штамм G52 ВБ, полученный на КК NIL-2 (КК эмбриона хомяка)	Протеин А <i>Staphylococcus aureus</i>	[29, 48]
N.C. Salvi et al., 2010	Сыворотка крови лошадей, мулов, пони	Вакцина Rabipur	Антитела к IgG лошади	[47]
<i>Bio-Rad Platelia TM Rabies II ad usum Veterinarium</i>	Сыворотка крови собак, кошек, лис	Гликопротеин вируса бешенства	Протеин А <i>Staphylococcus aureus</i>	[8, 49, 57]
В.И. Клюкина и соавт., 2008	Сыворотка крови собак, кошек, баранов, крупного рогатого скота	Вирус бешенства штамма CVS	Протеин А <i>Staphylococcus aureus</i>	[9]
А.М. Гулюкин и соавт., 2010	Сыворотка крови овец, собак, кошек, крупного рогатого скота, плотоядных, пробы глазной жидкости лисиц	Гликопротеин ВБ штамма «Овечий» ГНКИ, стандартный штамм CVS	Кроличьи антитела к IgG лисиц и собак, антитела к IgG быка и овец	[6]

В.И. Клюкина и соавт., 2012	Сыворотка крови собак	Гликопротеин ВБ штамма «Щелково-51»	Протеин А <i>Staphylococcus aureus</i>	[10]
А.Ю. Сухарьков и соавт., 2012	Сыворотки крови собак	Гликопротеин ВБ штамма ВНИ-ИЗЖ	Протеин А <i>Staphylococcus aureus</i>	[19]
A. Debnath et al., 2019	Сыворотка крови мышей	Очищенная инактивированная вакцина против бешенства, полученная на КК Vero	Овечьи антитела к мышинным IgG	[32]
Т.М. Грунина, 2019	Сыворотка крови крупного рогатого скота и овец	Рекомбинантный белок DBD-grG, включающий в себя нуклеотидную последовательность гена гликопротеина ВБ	Протеин А <i>Staphylococcus aureus</i>	[5]
Жидкофазный конкурентный ИФА				
J.J. Esterhuysen et al., 1995	Сыворотка крови людей, крупного рогатого скота, овец, коз, собак, лабораторных мышей, кроликов, львов, желтых мангустов, гиеновидных собак	Нуклеопротеин ВБ штамма CVS, экспрессированный в бакуловирусном векторе AcNPV3 на КК <i>Spodoptera frugiperda</i> , ВБ штамма Flury НЕР	Овечьи антитела к IgG морской свинки	[33]
Твердофазный конкурентный ИФА (с-ELISA)				
M. Sugiyama et al., 1997	Сыворотка крови собак	Нуклеопротеин ВБ штамма RC-НЛ, адаптированного к монослою КК CER	Стрептавидин	[54]
M. Mojzis et al., 2008, <i>BioPro ELISA Rabies Ab</i>	Сыворотка крови собак, кошек, лисиц, енотовидных собак, торакальная жидкость и экстракт <u>мышц лисиц</u>	ВБ штамма SAD-Bem, полученный на КК ВНК-21	Стрептавидин	[41, 26, 38, 56]
Н.А. Хисматуллина и соавт., 2012	Сыворотки крови собак, кошек, лисиц и крупного рогатого скота, овец	Гликопротеин ВБ штамма «Овечий» ГНКИ, стандартный штамм CVS	Кроличьи антитела к IgG лисиц и собак, антитела к IgG быка и овец	[20]
Ya. Aronthippaitoon et al., 2019	Сыворотка крови людей и собак	Вакцинный штамм ВБ PV2061 Pasteur, рекомбинантный гликопротеин ВБ штамма CVS-26 (белок RV-rG)	Антитела овцы к IgG мыши	[23]
D. Fontana et al., 2020	Сыворотка крови людей, собак, кошек, крупного рогатого скота, ягуаров	Очищенные вирусоподобные частицы	Стрептавидин	[35]

Оригинальное биотехнологическое решение было предложено Т.М. Груниной [5], использовавшей в качестве антигена в твердофазном непрямом ИФА рекомбинантный белок DBD-grG, включающий в себя аминокислотную последовательность декстран-связывающего домена DBD *Leuconostoc mesenteroides* и нуклеотидную последовательность гена гликопротеина вируса бешенства. Целевой белок экспрессировали в клетках *E. coli*, а затем проводили его одностадийную очистку за счет способности декстран-связывающего домена аффинно взаимодействовать с Сефадексом, химически модифицированным декстраном. Результаты исследования сывороток крови иммунизированных коров и баранов хорошо коррелировали с результатами реакции вирус-нейтрализации с флуоресцирующими антителами и реакции вирус-нейтрализации на мышах.

Тест-системы на основе ИФА, исключающие использование большого количества животных, могут

стать альтернативой референс-реакции вирус-нейтрализации на мышах для скрининга большого количества образцов в процессе производства антирабического иммуноглобулина. N.C. Salvi et al. доказали, что разделение иммунизированных для получения профилактического антирабического иммуноглобулина лошадей на группы «слабых», «средних» и «сильных» респондеров по результатам ИФА на начальном этапе иммунизации позволяет скорректировать схему иммунизации для дальнейшего получения максимальных титров антител к вирусу бешенства от каждого животного [47]. При сравнении образцов плазмы, очищенной сыворотки и иммуноглобулина авторы наблюдали хорошую корреляцию между результатами ИФА и реакции вирус-нейтрализации на мышах ($r=0,82, 0,923$ и $0,874$ соответственно).

Следует отметить, что даже для одобренных МЭБ коммерческих тест-систем остается нерешенной проблема недостаточной чувствительности ИФА по

сравнению с тестами нейтрализации вируса на культуре клеток. М. Wasniewski et al. сообщают, что при 100%-ной специфичности тест-системы «Platelia TM Rabies II ad usum Veterinarium» ее чувствительность составляет только 78,2%; при этом лишь 5 из 23 аккредитованных международных лабораторий получили удовлетворительные результаты по показателям специфичности и чувствительности ELISA по сравнению с FAVN [57]. Для повышения чувствительности теста авторы предложили установить пороговое значение титра антител для данного теста в 0,3 МЕ/мл вместо 0,5 МЕ/мл, однако это не было официально закреплено ни в Руководстве по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных МЭБ, ни в инструкции к данной тест-системе. Примечательно, что, по данным ряда исследований, аналогичный набор для выявления антител к гликопротеину вируса бешенства в образцах сыворотки крови и цереброспинальной жидкости людей обладает высокой специфичностью и чувствительностью по сравнению со стандартными тестами вирус-нейтрализации [34, 58].

Также вызывает вопросы эффективность тест-системы Serelisa TM Rabies Ab mono Indirect (метод предложен Cliquet et al. в 2004 г.) [29]. 8 из 16 лабораторий, протестировавших собственные образцы сывороток крови собак и кошек с помощью тестов FAVN

или RFFIT и Serelisa, заявили о неудовлетворительной чувствительности и специфичности Serelisa TM Rabies Ab mono Indirect (коэффициент соответствия методу вирус-нейтрализации составил менее 80%); при этом 4 лаборатории получили значительную долю ложноположительных результатов [48]. Коэффициент соответствия теста ИФА референс-методу (RFFIT или FAVN) составил для различных лабораторий от 67,5 до 92,0%.

Биотехнологическим решением проблемы низкой чувствительности непрямого ИФА и универсальности диагностикума в отношении сывороток крови разных видов животных стала разработка методов конкурентного иммуоферментного анализа. В 1995 г. J.J. Esterhuysen et al. предложили жидкофазный вариант конкурентного ИФА для обнаружения в сыворотке крови людей и животных антител к нуклеопротеину вируса бешенства [33]. Общая схема проведения реакции переключается с непрямой вариант ИФА (рис. 1). Для получения антирабических сывороток кроликов и морских свинок иммунизировали как вирусом бешенства штамма Flury NEP (High Egg Passage), так и нуклеопротеином вируса бешенства клона Gif-sur-Yvette штамма CVS, экспрессированным в бакуловирусном векторе AcNPV3 вируса полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV) на КК *Spodoptera frugiperda*.

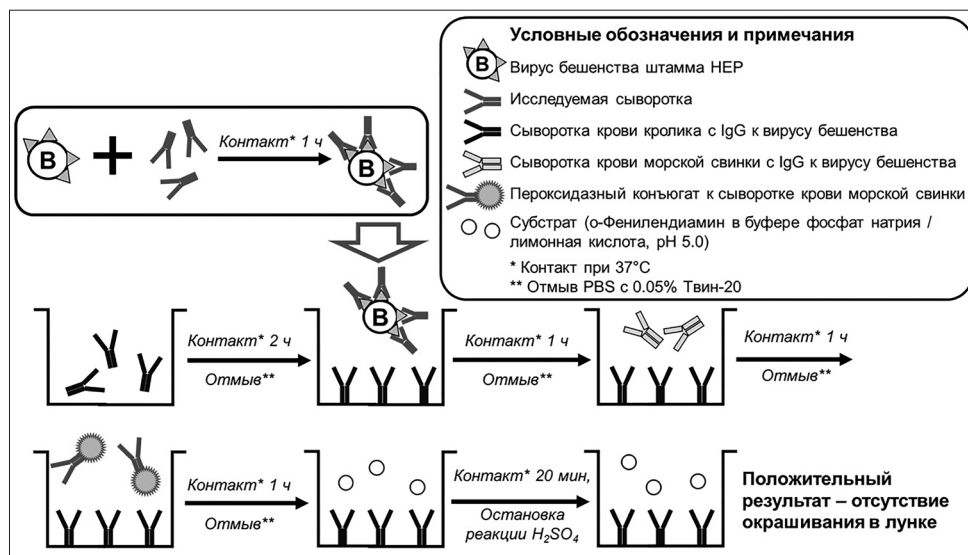


Рис. 1. Схема постановки жидкофазного варианта конкурентного иммуоферментного анализа (адаптировано с J.J. Esterhuysen et al., 1995) [33]

Уже в 1997 г. М. Sugiyama et al. разработали твердофазный конкурентный иммуоферментный анализ (с-ELISA) [54]. При изготовлении диагностических наборов на основе с-ELISA часто стали использовать стрептавидиновый пероксидазный конъюгат: высокая аффинность стрептавидина к биотинилированным моноклональным

антителам обеспечивает высокую специфичность и чувствительность теста (табл. 2, рис. 2). Большой популярностью пользуется коммерческая тест-система BioPro ELISA (метод предложен М. Mojzis et al. в 2008 г.), чувствительность и специфичность которой в отношении образцов разных видов животных доказана в многочисленных исследованиях [26,

41, 55, 56]. Т. Bedekovic et al. сравнили результаты определения титров антител в гемолитических образцах торакальной жидкости и экстрактах мышц BioPro ELISA с результатами ранее модифицированного ими метода mFAVN [25], а также изучили влияние термической обработки образцов на результат определения титров антител [26]. Диагностиче-

ская достоверность BioPro ELISA по сравнению с тестом mFAVN при использовании образцов без термической обработки составила 89,16%, а для термически обработанных образцов – 94,30%, что позволяет рекомендовать BioPro ELISA в качестве замены тестам вирус-нейтрализации при исследовании образцов низкого качества.

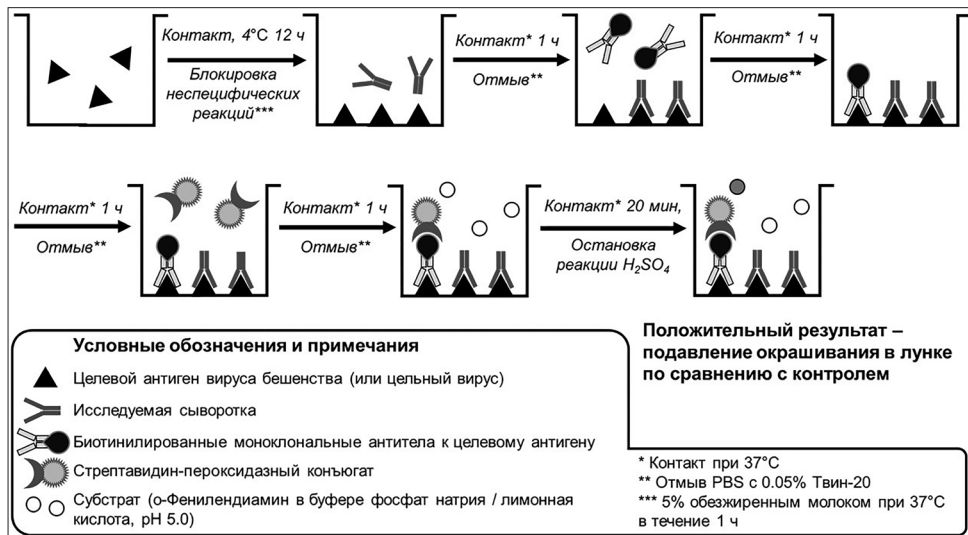


Рис. 2. Схема постановки твердофазного конкурентного ИФА со стрептавидин-пероксидазным конъюгатом

Моноклональные антитела, хорошо зарекомендовавшие себя при выявлении антигенов вируса бешенства [4], нашли широкое применение и в определении титров антирабических антител. В 2019 г. Ya. Aronhippaitoon et al. предложили вариант конкурентного ИФА с использова-

нием клона моноклонального антитела 1-46-12, способного распознавать конформационный эпитоп белка G вакцинного штамма вируса бешенства (рис. 3) [23]. Авторы выявили сильную корреляцию результатов данного метода с RFFIT при исследовании образцов сывороток крови людей и собак.

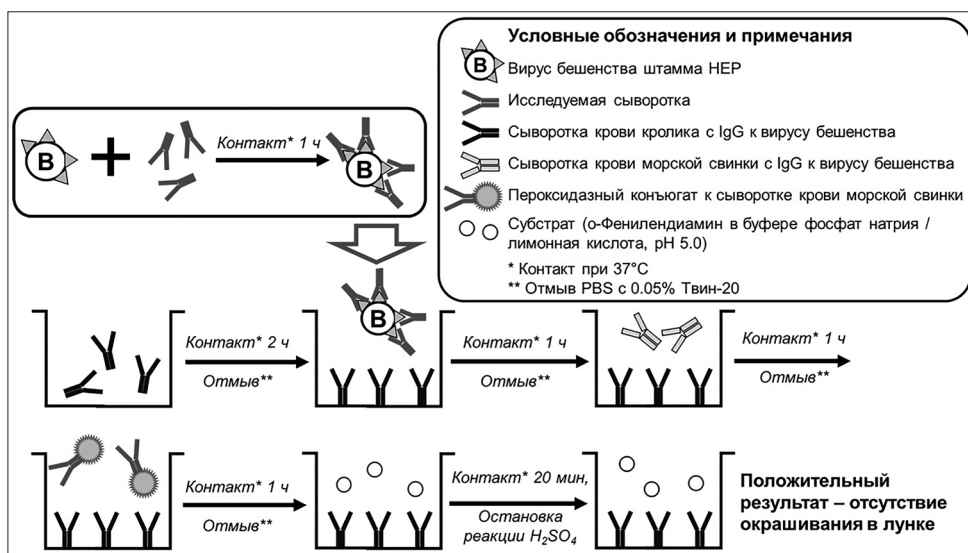


Рис. 3. Схема постановки твердофазного конкурентного ИФА со специфическим антивидовым конъюгатом (по Ya. Aronhippaitoon et al., 2019) [23]

Антигеном в конкурентном ИФА могут выступать как цельные вирионы, так и отдельные вирусные белки или даже вирусоподобные частицы. D. Fontana et al. применяли

в качестве антигена в конкурентном ИФА очищенные вирусоподобные частицы, полученные на стабильном клоне sP2E5 клеточной линии НЕК293 [35]. Обнаружение

специфических иммуноглобулинов посредством блокировки распознавания этих частиц биотинилированными моноклональными антителами АВ5 открывает возможность определять концентрацию антител до 0,06 МЕ/мл, что существенно меньше минимального протективного титра антител к вирусу бешенства в 0,5 МЕ/мл.

Альтернативные методы выявления антител к вирусу бешенства. Современная наука уже располагает рядом альтернативных методов определения антител к вирусу бешенства, пока что не одобренных МЭБ, однако являющихся перспективными разработками в области серодиагностики и иммунологии (табл. 3). Предложенные на данный момент альтернативные методы выявления антирабических вирус-нейтрализующих антител отличаются от стандартных RFFIT и FAVN как используемым в качестве антигена вирусом, так и способом визуализации продуктов реакции. В ряде работ предлагается использовать вакцинные [16] или инактивированные [42, 50] штаммы вируса бешенства вместо штамма CVS-11 для обеспечения большей безопасности сотрудников при проведении теста и, следовательно, возможности

аккредитации большего числа лабораторий для определения титров ВНА. Для выявления образующегося комплекса [антиген+антитело], помимо стандартных ФИТЦ-конъюгатов [2, 3, 15], предложено использовать антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена [27, 37, 46, 54], что исключает необходимость наличия в лаборатории такого дорогостоящего оборудования, как флуоресцентный микроскоп. Также разработаны методы прямой оценки подавления цитопатического действия (ЦПД) вируса антителами исследуемого образца [16]. С.В. Генералов с соавторами предложили точный метод определения титров ВНА путем регистрации флуоресценции отдельных клеток с помощью проточной цитометрии [3]. Для качественного определения протективного титра антител в 0,5 МЕ/мл предложен тест быстрого обнаружения вирус-нейтрализующих антител (Rapid Neutralizing Antibody detection test – RAPINA), представляющий собой тест-полоску, где для выявления образовавшегося комплекса [антиген+антитело] использованы конъюгированные с золотом моноклональные антитела к гликопротеину вируса бешенства [42, 50].

Таблица 3

Альтернативные методы выявления антител к вирусу бешенства

Метод	Автор, год	Материал для исследования	Культура клеток	Антиген	Компонент визуализации реакции	Признак положительной реакции
Методы определения вирус-нейтрализующих антител						
Быстрая ферментная иммунитировка внутриклеточных агентов, модификация RFFIT	P. Perrin et al., 1986 [46]	Сыворотка крови людей и мышей	ВНК-21	ВБ штамм CVS (нуклеокапсид)	Пероксидазный конъюгат с кроличьими IgG к нуклеокапсиду ВБ	Отсутствие окрашивания
Метод ингибции фокусов флуоресценции, модификация RFFIT	И.Ф. Вишняков и соавт., 1997 [15]	Сыворотка крови крупного рогатого скота, лошадей, собак	Почки сайги	ВБ штамм ТС-80	ФИТЦ-конъюгированные IgG к ВБ	Ингибция флуоресценции
Непрямой иммунопероксидазный тест вирус-нейтрализации	T.C. Cardoso et al., 2004 [27]	Сыворотки крови собак и крупного рогатого скота	CER	ВБ штамм CVS-32	Пероксидазный конъюгат с антителами козы к IgG мыши	Отсутствие окрашивания
Модификация FAVN	P. Hostnik, 2000 [37]	Сыворотка крови собак	ВНК-21	ВБ штамм CVS-11	Пероксидазный конъюгат с антителами козы к IgG мыши	Отсутствие окрашивания
Титрование антител по цитопатическому действию (ЦПД) вируса	И.А. Сливко и соавт., 2003 [16]	Сыворотка крови овец, собак, лисиц	Почки сайги	Вакцинный штамм ВБ 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ	ЦПД вируса на культуру клеток	Подавление ЦПД
Тест быстрого обнаружения вирус-нейтрализующих антител (RAPINA)	S. Shiota et al., 2009 [50, 42]	Сыворотка крови людей и собак	—	Инактивированный ВБ штамм CVS-11	Конъюгированные с золотом моноклональные антитела к гликопротеину ВБ	Отсутствие линии в тестовой зоне тест-полоски

Экспресс-анализ методом иммунофлуоресценции	Ю.К. Гаврилова и соавт., 2018 [2]	Сыворотка крови лошадей, в т.ч. гипериммунизированных	Vero, ВНК-21	Фиксированные штаммы ВБ Москва 3253 и CVS	ФИТЦ-конъюгированные IgG к ВБ	Ингибция флуоресценции
Проточная цитометрия	С.В. Генералов и соавт., 2019 [3]	Сыворотка крови гипериммунизированных лошадей	Vero	Фиксированный штамм ВБ Москва 3253	ФИТЦ-конъюгированные IgG к ВБ	Ингибция флуоресценции
Другие методы						
Иммуноэлектрофорез (СІЕ)	L.H.Q. da Silva et al., 2002 [52]	Сыворотка крови собак	–	ВБ штамма CVS 31/2	Кроличья антирабическая сыворотка	Отсутствие линий преципитации в агаровом геле
Непрямая РИФ (модификация метода N.H. Johnson & W.E. Richard, 1992 [38, 55])	P. Hostnik & J. Grom, 1997 [36]	Гемолитическая торакальная жидкость и кардиальная кровь лисиц	ВНК-21	ВБ штамма SAD B19	ФИТЦ-конъюгат к собачьим IgG	Флуоресценция
Прямой дот-иммуноанализ	Н.А. Подборонова и соавт., 2009 [17, 21]	Сыворотка крови людей и лошадей, в т.ч. антирабические гипериммунные сыворотки лошадей	Нет	Инактивированный фиксированный ВБ штамма «Москва-3253», конъюгированный с частицами коллоидного золота		Появление окрашенного пятна на нитроцеллюлозной мембране
Метод электрохемилюминесценции	X. Ma et al., 2012 [40]	Сыворотка крови людей, собак, енотов, цереброспинальная жидкость людей	КК BSR (клон КК ВНК)	Гликопротеин ВБ штамма ERA	Биотинилированные антивидовые IgG + SULFO-TAG стрептавидин	Электрохемилюминесценция

Следует отметить, что при производстве диагностических сывороток для оценки титров антител к вирусу бешенства широко используются такие «классические» серологические методы, как РДП и РСК [11]. Однако для определения преципитирующих антител к вирусу бешенства, помимо РДП, хорошо показал себя метод иммуноэлектрофореза (Counter Immunoelectrophoresis Test – СІЕ), результаты которого совпадали на 79,7% с результатами теста вирус-нейтрализации на мышах [52]. Также в арсенале серодиагностики присутствуют: непрямой вариант РИФ, позволяющий исследовать образцы низкого качества, проявляющие цитотоксичность в реакциях вирус-нейтрализации [36]; прямой вариант дот-иммуноанализа на нитроцеллюлозной мембране, не требующий культивирования вируса в живой системе [17, 21]; метод электрохемилюминесценции, в котором в качестве антигена используется гликопротеин вируса бешенства штамма ERA (Evelyn-Rokitnicki-Abelseth), а для визуализации образовавшегося комплекса [антиген+антитело] – биотинилированные антивидовые антитела и SULFO-TAG стрептавидин [40].

Заключение

Совершенствование методов определения титров антител к вирусу бешенства представляет собой одно из

основных направлений в профилактике данной инфекции. На данный момент отечественными и зарубежными исследователями разработан спектр методов для решения этой задачи. Ведутся работы по усовершенствованию рекомендуемых МЭБ методов определения вирус-нейтрализующих антител (RFFIT и FAVN), проведение которых является обязательным при международной торговле и транспортировке животных. Разработан ряд различных вариантов иммуноферментного анализа, позволяющих за короткое время исследовать большое количество образцов в рамках оценки эффективности кампаний массовой вакцинации, а также предложены методы определения ВНА в образцах низкого качества, в том числе гемолитической торакальной жидкости. Регулярно проводятся межлабораторные исследования по оценке специфичности и чувствительности коммерческих тест-систем, что позволяет констатировать их достоинства и недостатки и корректировать направление дальнейших разработок в области серодиагностики бешенства. Помимо широко применяемых, предлагаются альтернативные методы определения антител к вирусу бешенства, предусматривающие как качественное определение протективного титра антител к вирусу (например, с помощью тест-полосок), так и количественное определение титров с использованием таких высокоточных методов, как проточная цитометрия. Так или иначе, но доступный для эпизоотологов и вете-

ринарных врачей арсенал методов выявления антител к вирусу бешенства продолжает расширяться.

Литература

1. Аналитический отчет по эпизоотической ситуации в РФ за 3 квартал 2020 г. (по данным департамента ветеринарии МСХ) [Электронный ресурс]. — Режим доступа: https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/iac/rf/2020/iac2020_3_quater.pdf. — (Дата обращения: 28.01.2021).
2. Гаврилова Ю.К. и др. Экспресс-анализ активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в клеточных культурах методом иммунофлуоресценции // Биотехнология. — 2018. — Т. 34. — № 4. — С. 83–88.
3. Генералов С.В. и др. Проточная цитометрия при анализе вируснейтрализующей активности антирабических сывороток и иммуноглобулина // Инфекция и иммунитет. — 2019. — Т. 9. — № 1. — С. 107–114.
4. Грибенча С.В. и др. Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства // Вопросы вирусологии. — 2013. — Т. 58. — № 5. — С. 38–43.
5. Грунина Т.М. Использование рекомбинантного белка DBD-gpG для серодиагностики антител к вирусу бешенства в сыворотках животных / Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии: сб. тез. докл. 19-й Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева. — М.: ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 2019. — С. 182–183.
6. Гулюкин А.М., Хисматуллина Н.А., Чернов А.Н., Ермакова Н.И., Сабирова В.В. Оценка эффективности вакцинопрофилактики бешенства с помощью иммуноферментной тест-системы / Биотехнология: экология крупных городов: матер. Московской межд. науч.-практич. конф. — М.: ЗАО «Экспобиохим-технология», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2010. — С. 465–466.
7. Директива совета ЕС 92/65/ЕЕС от 13.07.1992, [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31992L0065&qid=1611848238605&from=EN>. — (Дата обращения: 28.01.2021).
8. Инструкция к диагностическому набору PLATELIA RABIES II KIT Ad Usum Veterinarium [Электронный ресурс]. — Режим доступа: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/User_27s_20manual_PlateliaRabiesII.pdf. — (Дата обращения: 28.01.2021).
9. Клюкина В.И., Рахманин П.В., Проничев А.Б. Иммуноферментная тест-система для определения уровня иммунитета у вакцинированных против бешенства кошек и собак // Ветеринария и кормление. — 2008. — № 3. — С. 24–25.
10. Клюкина В.И. и др. ИФА для оценки эффективности вакцинации собак против бешенства // Ветеринария и кормление. — 2012. — № 6. — С. 28–29.
11. Клюкина В.И. и др. Эффективность применения адьюванта и иммуномодулирующих препаратов при иммунизации животных вирусом бешенства // Ветеринария и кормление. — 2019. — № 5. — С. 17–18.
12. Лосич М.А. и др. Разработка и иммунобиологические свойства новой антирабической вакцины «РабиФел» // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. — 2012. — № 2. — С. 10–14.
13. Непоклонова И.В. и др. Сравнительный анализ факторов формирования антирабического иммунитета у мелких домашних животных // Ветеринария. — 2017. — № 4. — С. 26–34.
14. Официальный сайт Всемирной организации здравоохранения [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDRABIESHUMANDEATHS?lang=en>. — Reported number of human rabies deaths. Data by country. — (Дата обращения: 14.04.2014).
15. Пат. 2130187 Российская Федерация, МПК G 01 N 33/569, А 61 К 39/205. Способ определения антирабических вируснейтрализующих антител / Вишняков И.Ф., Недосеков В.В., Груздев К.Н., Бальшев В.М., Жестерев В.И., Горшкова Т.Ф.; заявитель и патентообладатель ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии. — № 97116427/13; заявл. 01.10.1997; опубл. 10.05.1999. — 5 с.
16. Пат. 2254575 Российская Федерация, МПК G 01 N 33/569. Способ титрования антирабических вируснейтрализующих антител / Сливко И.А., Недосеков В.В., Жестерев В.И., Горшкова Т.Ф., Курильчук Ю.Н., Анисимова Л.И., Жданова Н.А., Баньковский Д.О., Лаптева О.Г., Хухоров И.Ю., Ногина И.В.; заявитель и патентообладатель ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии. — № 2003120728/15; заявл. 10.07.2003; опубл. 20.06.2005, Бюл. № 17. — 6 с.
17. Пат. 2360252 Российская Федерация, МПК G 01 N 33/532. Диагностический и тест-система для определения активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина in vitro методом дот-иммуноанализа / Подборонова Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Киреев М.Н., Кутырев В.В.; заявитель и патентообладатель ФГУЗ «РосНИПЧИ «Микроб». — № 2008113918/15; заявл. 09.04.2008; опубл. 27.06.2009, Бюл. № 18. — 11 с.
18. Прог. для ЭВМ 2016617051 Российская Федерация. Программа для расчета результатов реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышках по методу Рида и Менча / Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Савицкая Л.В., Лобовикова О.А., Никифоров А.К.; заявитель и патентообладатель ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». — № 2016612171; заявл. 15.03.2016; опубл. 20.07.2016. — 1 с.

19. Сухарьков А.Ю., Чернышова Е.В., Назаров Н.А. Перспективы использования иммуноферментного анализа для оценки эффективности антирабической вакцинации животных // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. — 2012. — № 2(14). — С. 34–40.
20. Хисматуллина Н.А. и др. Разработка и применение блок-иммуноферментной тест-системы для контроля эффективности вакцинопрофилактики бешенства // Ветеринарная медицина. — 2012. — № 96. — С. 64–66.
21. Шарапова Н.А. и др. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе // Проблемы особо опасных инфекций. — 2010. — № 1(103). — С. 63–66.
22. Шмаров М.М. и др. Иммуногенные и защитные свойства рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа, экспрессирующего ген гликопротеина G вируса бешенства вакцинного штамма РВ-97 // Иммунология. — 2020. — № 41(4). — С. 312–325.
23. Aronhipaitoon Y., Samer W., Atuntee T., et al. A cost effective easy competitive enzyme-linked immunosorbent assay suitable for monitoring protective immunity against the rabies virus in the serum of humans and dogs // Jpn. J. Infect. Dis. — 2019. — Vol. 72(2). — P. 99–105.
24. Atanasiu P., Perrin P. Microméthode immunoenzymatique de titrage des anticorps antirabiques: utilisation de la glycoprotéine rabique et de la protéine A conjuguées à la peroxydase [Micromethod for rabies antibody detection by immunoenzymatic assay with Staphylococcus protein A (author's transl.)] // Ann. Microbiol. (Paris). — 1979. — Vol. 130(2). — P. 257–268.
25. Bedekovic T., Lemo N., Lojkić I., et al. Modification of the fluorescent antibody virus neutralisation test-elimination of the cytotoxic effect for the detection of rabies virus neutralising antibodies // J. Virol. Methods. — 2013. — Vol. 189(1). — P. 204–208.
26. Bedekovic T., Simic I., Kresic N., et al. Evaluation of ELISA for the detection of rabies virus antibodies from the thoracic liquid and muscle extract samples in the monitoring of fox oral vaccination campaigns // BMC Vet. Res. — 2016. — Vol. 12. — P. 76.
27. Cardoso T.C., Silva L.H., Albas A., Ferreira H.L., Perri S.H. Rabies neutralizing antibody detection by indirect immunoperoxidase serum neutralization assay performed on chicken embryo related cell line // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. — 2004. — Vol. 99(5). — P. 531–534.
28. Cliquet F., Aubert M., Sagné L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody // J. Immunol. Methods. — 1998. — Vol. 212(1). — P. 79–87.
29. Cliquet F., McElhinney L.M., Servat A., et al. Development of a qualitative indirect ELISA for the measurement of rabies virus-specific antibodies from vaccinated dogs and cats // J. Virol. Methods. — 2004. — Vol. 117(1). — P. 1–8.
30. Cliquet F., Müller T., Mutinelli F., et al. Standardisation and establishment of a rabies ELISA test in European laboratories for assessing the efficacy of oral fox vaccination campaigns // Vaccine. — 2003. — Vol. 21(21–22). — P. 2986–2993.
31. Cliquet F., Sagné L., Schereffer J.L., Aubert M.F. ELISA test for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields // Vaccine. — 2000. — Vol. 18(28). — P. 3272–3279.
32. Debnath A., Pathak D.C., Ramamurthy N., et al. Serological profiling of rabies antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay and its comparative analysis with rapid fluorescent focus inhibition test in mouse model // Vet. World. — 2019. — Vol. 12(1). — P. 126–130.
33. Esterhuysen J.J., Prehaud C., Thomson G.R. A liquid-phase blocking ELISA for the detection of antibodies to rabies virus // J. Virol. Methods. — 1995. — Vol. 51(1). — P. 31–42.
34. Feysaguet M., Dacheux L., Audry L., et al. Multicenter comparative study of a new ELISA, PLATELIA RABIES II, for the detection and titration of anti-rabies glycoprotein antibodies and comparison with the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) on human samples from vaccinated and non-vaccinated people // Vaccine. — 2007. — Vol. 25(12). — P. 2244–2251.
35. Fontana D., Rodriguez M.C., Garay E., Russo S., Prieto C. Optimization and validation of a blocking ELISA for quantitation of anti-rabies immunoglobulins in multispecies sera // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2020. — Vol. 104(9). — P. 4127–4139.
36. Hostnik P., Grom J. An indirect immunofluorescent test for detection of rabies virus antibodies in foxes // J. Wildl. Dis. — 1997. — Vol. 33(1). — P. 143–145.
37. Hostnik P. The modification of fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) test for the detection of antibodies to rabies virus // J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health. — 2000. — Vol. 47(6). — P. 423–427.
38. Johnson N.H., and Richard W.E. Rabies virus / In Laboratory diagnosis of viral infections, E.H. Lennette (editor). — Marcel Dekker, Inc., New York, 1992. — P. 669–684.
39. Kennedy L.J., Lunt M., Barnes A., et al. Factors influencing the antibody response of dogs vaccinated against rabies // Vaccine. — 2007. — Vol. 25(51). — P. 8500–8507.
40. Ma X., Niezgodna M., Blanton J.D., Recuenco S., Rupprecht C.E. Evaluation of a new serological technique for detecting rabies virus antibodies following vaccination // Vaccine. — 2012. — Vol. 30(36). — P. 5358–5362.
41. Mojzis M., Korytar P., Jerg S. Development and validation of ELISA test for detection of rabies anti-glycoprotein antibodies. — Atlanta: Proceedings of the International Conference on Rabies in the Americas (RITA XIX), 2008. — P. 48–49.
42. Nishizono A., Yamada K., Khawplod P., et al. Evaluation of an improved rapid neutralizing antibody detection test (RAPINA) for qualitative and semiquantitative detection of

- rabies neutralizing antibody in humans and dogs // *Vaccine*. — 2012. — Vol. 30(26). — P. 3891–3896.
43. Oh S.Y., Kim S.A., Kim J.Y., Yoo H.S., Lee K.K., Shin N.S. Detection of antibodies against the rabies virus in Korean raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides koreensis*) // *J. Zoo. Wildl. Med.* — 2012. — Vol. 43(1). — P. 174–176.
 44. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Eighth Edition, 2018 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.17_RABIES.pdf. — (Дата обращения: 28.01.2021).
 45. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Sixth Edition, 2008 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/pdf/2.01.13_RABIES.pdf. — (Дата обращения: 28.01.2021).
 46. Perrin P., Versmisse P., Delagneau J.F., Lucas G., Rollin P.E., Sureau P. The influence of the type of immunosorbent on rabies antibody EIA; advantages of purified glycoprotein over whole virus // *J. Biol. Stand.* — 1986. — Vol. 14(2). — P. 95–102.
 47. Salvi N.C., Deopurkar R.L., Waghmare A.B., et al. Validation of indirect elisa for quantitative testing of rabies antibodies during production of antirabies serum using equines // *Procedia in Vaccinology*. — 2010. — Vol. 2(1). — P. 3–11.
 48. Servat A., Cliquet F. OIE Reference Laboratory for Rabies, WHO. Collaborative study to evaluate a new ELISA test to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic carnivores // *Virus Res.* — 2006. — Vol. 120(1–2). — P. 17–27.
 49. Servat A., Feyssaguet M., Blanchard I., et al. A quantitative indirect ELISA to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic and wild carnivores // *J. Immunol. Methods*. — 2007. — Vol. 318(1–2). — P. 1–10.
 50. Shiota S., Mannen K., Matsumoto T., et al. Development and evaluation of a rapid neutralizing antibody test for rabies // *J. Virol. Methods*. — 2009. — Vol. 161(1). — P. 58–62.
 51. Shi W., Kou Y., Xiao J., et al. Comparison of immunogenicity, efficacy and transcriptome changes of inactivated rabies virus vaccine with different adjuvants // *Vaccine*. — 2018. — Vol. 36(33). — P. 5020–5029.
 52. Silva L.H., Bissoto C.E., Carvalho Cd., Cardoso T.C., Pinheiro D.M., Perri S.H. Comparison between the counter immunoelectrophoresis test and mouse neutralization test for the detection of antibodies against rabies virus in dog sera // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. — 2002. — Vol. 97(2). — P. 259–261.
 53. Smith J.S., Yager P.A., Baer G.M. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody // *Bull. World Health Organ.* — 1973. — Vol. 48(5). — P. 535–541.
 54. Sugiyama M., Yoshiki R., Tatsuno Y., et al. A new competitive enzyme-linked immunosorbent assay demonstrates adequate immune levels to rabies virus in compulsorily vaccinated Japanese domestic dogs // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 1997. — Vol. 4(6). — P. 727–730.
 55. Wasniewski M., Almeida I., Baur A., et al. First international collaborative study to evaluate rabies antibody detection method for use in monitoring the effectiveness of oral vaccination programmes in fox and raccoon dog in Europe // *J. Virol. Methods*. — 2016. — Vol. 238. — P. 77–85.
 56. Wasniewski M., Cliquet F. Evaluation of ELISA for detection of rabies antibodies in domestic carnivores // *J. Virol. Methods*. — 2012. — Vol. 179(1). — P. 166–175.
 57. Wasniewski M., Labbe A., Tribout L., et al. Evaluation of a rabies ELISA as an alternative method to seroneutralisation tests in the context of international trade of domestic carnivores // *J. Virol. Methods*. — 2014. — Vol. 195. — P. 211–220.
 58. Welch R.J., Anderson B.L., Litwin C.M. An evaluation of two commercially available ELISAs and one in-house reference laboratory ELISA for the determination of human anti-rabies virus antibodies // *J. Med. Microbiol.* — 2009. — Vol. 58(Pt 6). — P. 806–810.
 59. World health organisation. Laboratory Techniques in Rabies, Fourth Edition, Meslin F.-X., Kaplan M.M. & Koprowski H., eds. — WHO, Geneva, Switzerland, 1996.
 60. World health organization. World Health Organisation Expert Committee on Biological Standards, Thirty-Fifth Report; WHO Technical Report Series No. 725. — WHO, Geneva, Switzerland, 1985.

References

1. Analiticheskiy otchet po epizooticheskoy situatsii v RF za 3 kvartal 2020 g (po dannym departamenta veterinarii MSKH) [Elektronnyy resurs]. Rezhim dostupa: https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/iac/rf/2020/iac2020_3_quater.pdf. — (Data obrashcheniya: 28.01.2021). (in Russian).
2. Gavrilova YuK i dr. Ekspress-analiz aktivnosti antirabicheskikh syvorotok i immunoglobulina v kletochnykh kul'turakh metodom immunofluoresentsii. *Biotekhnologiya* 2018; 34(4):83–88 (in Russian).
3. Generalov SV i dr. Protochnaya tsitometriya pri analize virusneytralizuyushchey aktivnosti antirabicheskikh syvorotok i immunoglobulina. *Infektsiya i immunitet* 2019; 9(1):107–114.
4. Gribencha SV i dr. Polucheniye monoklonal'nykh antitel k nukleoproteinu virusa beshenstva. *Voprosy virusologii* 2013; 58(5):38–43 (in Russian).
5. Grunina TM. Ispol'zovaniye rekombinantnogo belka DBD-gpG dlya serodiagnostiki antitel k virusu beshenstva v syvorotkakh zhivotnykh. *Biotekhnologiya v rasteniyevodstve, zhivotnovodstve i sel'skokhozyaystvennoy mikrobiologii: sb tez dokl 19-y Vserossiyskoy konferentsii molodykh uchenykh, posvyashchennoy pamyati akademika RASKHN Georgiya Sergeyevicha Muromtseva*. Moscow: FGBNU «Vserossiyskiy nauchno-issledovatel'skiy institut sel'skokhozyaystvennoy biotekhnologii», 2019: 182–183 (in Russian).

6. Gulyukin AM, Khismatullina NA, Chernov AN, Yermakova NI, Sabirova VV. Otsenka effektivnosti vaksino profilaktiki beshenstva s pomoshch'yu immunofermentnoy test-sistemy. *Biotehnologiya: ekologiya krupnykh gorodov: mater. Moskovskoy mezhd. nauch.-praktich. konf. Moscow: ZAO «Ekspobiokhim-tehnologiya», RKHTU im DI Mendeleeva, 2010: 465–466 (in Russian).*
7. EU Council Directive 92/65/EEC ot 13.07.1992, [Elektronnyy resurs]. Rezhim dostupa: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31992L0065&qid=1611848238605&from=EN>. (Data obrashcheniya: 28.01.2021).
8. Instruksiya k diagnosticheskomu naboru PLATELIA RABIES II KIT Ad Usum Veterinarium [Elektronnyy resurs]. Rezhim dostupa: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/User_27s_20manual_PlateliaRabiesII.pdf. – (Data obrashcheniya: 28.01.2021).
9. Klyukina VI, Rakhmanin PV, Pronichev AB. Immunofermentnaya test-sistema dlya opredeleniya urovnya immuniteta u vaksinirovannykh protiv beshenstva koshek i sobak. *Veterinariya i kormleniye 2008; 3:24–25 (in Russian).*
10. Klyukina VI i dr. IFA dlya otsenki effektivnosti vaksinatсии sobak protiv beshenstva. *Veterinariya i kormleniye 2012; 6:28–29 (in Russian).*
11. Klyukina VI i dr. Effektivnost' primeneniya ad'yuvanta i immunomoduliruyushchikh preparatov pri immunizatsii zhivotnykh virusom beshenstva. *Veterinariya i kormleniye 2019; 5:17–18 (in Russian).*
12. Losich MA i dr. Razrabotka i immunobiologicheskkiye svoystva novoy antirabicheskoy vaksiny «Rabifel». *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Melkiye domashniye i dikiye zhivotnyye 2012; 2:10–14 (in Russian).*
13. Nepoklonova IV i dr. Sravnitel'nyy analiz faktorov formirovaniya antirabicheskogo immuniteta u melkikh domashnikh zhivotnykh. *Veterinariya 2017; 4:26–34 (in Russian).*
14. Ofitsial'nyy sayt Vsemirnoy organizatsii zdравookhraneniya [Elektronnyy resurs]. – Rezhim dostupa: <https://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDRABIESHUMANDEATHS?lang=en>. Reported number of human rabies deaths. Data by country. (Data obrashcheniya: 14.04.2014).
15. Pat. 2130187 Rossiyskaya Federatsiya, MPK G 01 N 33/569, A 61 K 39/205. Sposob opredeleniya antirabicheskikh virusneytralizuyushchikh antitel. Vishnyakov IF, Nedosekov VV, Gruzdev KN, Balyshev VM, Zhesterev VI, Gorshkova TF.; zayavitel' i patentoobladatel' VNII veterinarnoy virusologii i mikrobiologii. № 97116427/13; zayavl 01.10.1997; opubl 10.05.1999. 5 s (in Russian).
16. Pat. 2254575 Rossiyskaya Federatsiya, MPK G 01 N 33/569. Sposob titrovaniya antirabicheskikh virusneytralizuyushchikh antitel. Slivko IA, Nedosekov VV, Zhesterev VI, Gorshkova TF, Kuril'chuk YUN, Anisimova LI, Zhdanova NA, Ban'kovskiy DO, Lapteva OG, Khukhorov IYU, Nogina IV; zayavitel' i patentoobladatel' VNII veterinarnoy virusologii i mikrobiologii. № 2003120728/15; zayavl 10.07.2003; opubl 20.06.2005, Byul № 17. 6 s (in Russian).
17. Pat. 2360252 Rossiyskaya Federatsiya, MPK G 01 N 33/532. Diagnostikum i test-sistema dlya opredeleniya aktivnosti antirabicheskikh syvorotok i preparata geterologichnogo antirabicheskogo immunoglobulina in vitro metodom dot-immunoanaliza. Podboronova NA, Abramova YeG, Nikiforov AK, Krasnov YAM, Guseva NP, Kireyev MN, Kutirev VV; zayavitel' i patentoobladatel' FGUZ «RosNIPCHI «Mikrob». № 2008113918/15; zayavl 09.04.2008; opubl 27.06.2009, Byul № 18. 11 s (in Russian).
18. Prog. dlya EVM 2016617051 Rossiyskaya Federatsiya. Programma dlya rascheta rezul'tatov reaktsii neytralizatsii virusa beshenstva na belykh myshakh po metodu Rida i Mencha. Generalov SV, Abramova YeG, Savitskaya LV, Lobovikova OA, Nikiforov AK; zayavitel' i patentoobladatel' FKUZ RosNIPCHI «Mikrob». № 2016612171; zayavl 15.03.2016; opubl 20.07.2016. 1 s (in Russian).
19. Sukhar'kov AYU, Chernyshova YeV, Nazarov NA. Perspektivy ispol'zovaniya immunofermentnogo analiza dlya otsenki effektivnosti antirabicheskoy vaksinatсии zhivotnykh. *Aktual'nyye voprosy veterinarnoy biologii 2012; 2(14):34–40 (in Russian).*
20. Khismatullina NA i dr. Razrabotka i primeneniye blok-immunofermentnoy test-sistemy dlya kontrolya effektivnosti vaksino profilaktiki beshenstva. *Veterinarnaya meditsina 2012; 96:64–66 (in Russian).*
21. Sharapova NA i dr. Opredeleniye aktivnosti antirabicheskikh syvorotok i preparata geterologichnogo antirabicheskogo immunoglobulina in vitro v dot-immunoanalize. *Problemy osobopasnykh infektsiy 2010; 1(103):63–66 (in Russian).*
22. Shmarov M.M. i dr. Immunogennyye i zashchitnyye svoystva rekombinantnogo adenovirusa cheloveka 5-go serotipa, ekspressiruyushchego gen glikoproteina G virusa beshenstva vaksinnogo shtamma RV-97. *Immunologiya 2020; 41(4):312–325. (in Russian).*
23. Aronhippaitoon Y, Samer W, Atuntee T, et al. A cost effective easy competitive enzyme-linked immunosorbent assay suitable for monitoring protective immunity against the rabies virus in the serum of humans and dogs. *Jpn J Infect Dis 2019; 72(2):99–105.*
24. Atanasiu P, Perrin P. Microméthode immunoenzymatique de titrage des anticorps antirabiques: utilisation de la glycoprotéine rabique et de la protéine A conjuguées à la peroxydase [Micromethod for rabies antibody detection by immunoenzymatic assay with Staphylococcus protein A (author's transl)]. *Ann Microbiol (Paris) 1979; 130(2):257–268.*
25. Bedekovic T, Lemo N, Lojkić I, et al. Modification of the fluorescent antibody virus neutralisation test-elimination of the cytotoxic effect for the detection of rabies virus neutralising antibodies. *J Virol Methods 2013; 189(1):204–208.*

26. Bedekovic T, Simic I, Kresic N, et al. Evaluation of ELISA for the detection of rabies virus antibodies from the thoracic liquid and muscle extract samples in the monitoring of fox oral vaccination campaigns. *BMC Vet Res* 2016; 12: 76.
27. Cardoso TC, Silva LH, Albas A, Ferreira HL, Perri SH. Rabies neutralizing antibody detection by indirect immunoperoxidase serum neutralization assay performed on chicken embryo related cell line. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99(5):531–534.
28. Cliquet F, Aubert M, Sagné L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J Immunol Methods* 1998; 212(1):79–87.
29. Cliquet F, McElhinney LM, Servat A, et al. Development of a qualitative indirect ELISA for the measurement of rabies virus-specific antibodies from vaccinated dogs and cats. *J Virol Methods* 2004; 117(1):1–8.
30. Cliquet F, Müller T, Mutinelli F, et al. Standardisation and establishment of a rabies ELISA test in European laboratories for assessing the efficacy of oral fox vaccination campaigns. *Vaccine* 2003; 21(21–22):2986–2993.
31. Cliquet F, Sagné L, Schereffer JL, Aubert MF. ELISA test for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields. *Vaccine* 2000; 18(28):3272–3279.
32. Debnath A, Pathak DC, Ramamurthy N, et al. Serological profiling of rabies antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay and its comparative analysis with rapid fluorescent focus inhibition test in mouse model. *Vet World* 2019; 12(1):126–130.
33. Esterhuysen JJ, Prehaud C, Thomson GR. A liquid-phase blocking ELISA for the detection of antibodies to rabies virus. *J Virol Methods* 1995; 51(1):31–42.
34. Feysaguet M, Dacheux L, Audry L, et al. Multicenter comparative study of a new ELISA, PLATELIA RABIES II, for the detection and titration of anti-rabies glycoprotein antibodies and comparison with the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) on human samples from vaccinated and non-vaccinated people. *Vaccine* 2007; 25(12):2244–2251.
35. Fontana D, Rodriguez MC, Garay E, Russo S, Prieto C. Optimization and validation of a blocking ELISA for quantitation of anti-rabies immunoglobulins in multispecies sera. *Appl Microbiol Biotechnol* 2020; 104(9):4127–4139.
36. Hostnik P, Grom J. An indirect immunofluorescent test for detection of rabies virus antibodies in foxes. *J Wildl Dis* 1997; 33(1):143–145.
37. Hostnik P. The modification of fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) test for the detection of antibodies to rabies virus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2000; 47(6):423–427.
38. Johnson NH, and Richard WE. Rabies virus. In *Laboratory diagnosis of viral infections*, E.H. Lennette (editor). Marcel Dekker, Inc, New York, 1992:669–684.
39. Kennedy LJ, Lunt M, Barnes A, et al. Factors influencing the antibody response of dogs vaccinated against rabies. *Vaccine* 2007; 25(51):8500–8507.
40. Ma X, Niezgoda M, Blanton JD, Recuenco S, Rupprecht CE. Evaluation of a new serological technique for detecting rabies virus antibodies following vaccination. *Vaccine* 2012. 30(36):5358–5362.
41. Mojzis M, Korytar P, Jerg S. Development and validation of ELISA test for detection of rabies anti-glycoprotein antibodies. Atlanta: Proceedings of the International Conference on Rabies in the Americas (RITA XIX), 2008:48–49.
42. Nishizono A, Yamada K, Khawplod P, et al. Evaluation of an improved rapid neutralizing antibody detection test (RAPINA) for qualitative and semiquantitative detection of rabies neutralizing antibody in humans and dogs. *Vaccine* 2012; 30(26):3891–3896.
43. Oh SY, Kim SA, Kim JY, Yoo HS, Lee KK, Shin NS. Detection of antibodies against the rabies virus in Korean raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides koreensis*). *J Zoo Wildl Med* 2012; 43(1):174–176.
44. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Eighth Edition, 2018 [Elektronnyy resurs]. Rezhim dostupa: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.17_RABIES.pdf. (Data obrashcheniya: 28.01.2021).
45. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Sixth Edition, 2008 [Elektronnyy resurs]. Rezhim dostupa: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/pdf/2.01.13_RABIES.pdf. (Data obrashcheniya: 28.01.2021).
46. Perrin P, Versmisse P, Delagneau JF, Lucas G, Rollin PE, Sureau P. The influence of the type of immunosorbent on rabies antibody EIA; advantages of purified glycoprotein over whole virus. *J Biol Stand* 1986; 14(2):95–102.
47. Salvi NC, Deopurkar RL, Waghmare AB, et al. Validation of indirect elisa for quantitative testing of rabies antibodies during production of antirabies serum using equines. *Procedia in Vaccinology* 2010; 2(1):3–11.
48. Servat A, Cliquet F. OIE Reference Laboratory for Rabies, WHO. Collaborative study to evaluate a new ELISA test to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic carnivores. *Virus Res* 2006; 120(1–2):17–27.
49. Servat A, Feysaguet M, Blanchard I, et al. A quantitative indirect ELISA to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic and wild carnivores. *J Immunol Methods* 2007; 318(1–2):1–10.
50. Shiota S, Mannen K, Matsumoto T, et al. Development and evaluation of a rapid neutralizing antibody test for rabies. *J Virol Methods* 2009; 161(1):58–62.
51. Shi W, Kou Y, Xiao J, et al. Comparison of immunogenicity, efficacy and transcriptome changes of inactivated rabies virus vaccine with different adjuvants. *Vaccine* 2018; 36(33):5020–5029.
52. Silva LH, Bissoto CE, Carvalho Cd, Cardoso TC, Pinheiro DM, Perri SH. Comparison between the counter immunoelectrophoresis test and mouse neutralization test for the detection of antibodies against rabies virus in dog sera. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(2):259–261.

53. Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull World Health Organ* 1973; 48(5):535–541.
54. Sugiyama M, Yoshiki R, Tatsuno Y, et al. A new competitive enzyme-linked immunosorbent assay demonstrates adequate immune levels to rabies virus in compulsorily vaccinated Japanese domestic dogs. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4(6):727–730.
55. Wasniewski M, Almeida I, Baur A, et al. First international collaborative study to evaluate rabies antibody detection method for use in monitoring the effectiveness of oral vaccination programmes in fox and raccoon dog in Europe. *J Virol Methods* 2016; 238:77–85.
56. Wasniewski M, Cliquet F. Evaluation of ELISA for detection of rabies antibodies in domestic carnivores. *J Virol Methods* 2012; 179(1):166–175.
57. Wasniewski M, Labbe A, Tribout L, et al. Evaluation of a rabies ELISA as an alternative method to seroneutralisation tests in the context of international trade of domestic carnivores. *J Virol Methods* 2014; 195:211–220.
58. Welch RJ, Anderson BL, Litwin CM. An evaluation of two commercially available ELISAs and one in-house reference laboratory ELISA for the determination of human anti-rabies virus antibodies. *J Med Microbiol* 2009; 58(Pt 6):806–810.
59. World health organisation. *Laboratory Techniques in Rabies, Fourth Edition*, Meslin F-X, Kaplan MM & Koprowski H, eds. WHO, Geneva, Switzerland, 1996.
60. World health organization. *World Health Organisation Expert Committee on Biological Standards, Thirty-Fifth Report; WHO Technical Report Series No 725*. WHO, Geneva, Switzerland, 1985.

BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS OF IMPROVING DETECTION METHODS ANTIBODIES TO ANIMAL RABIES VIRUS

V.A. LOBANOVA, V.I. KLYUKINA

All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry, Biokombinat village, Moscow region

The review analyzed the literature on the development and improvement of both those already approved by the International Epizootics Bureau (OEB) and alternative methods for detecting antibodies to rabies virus in biological fluids of animals. Sources from the databases of the electronic libraries e-library and PubMed and others were used. Currently, work is underway to improve the methods recommended by the OEB for the determination of virus-neutralizing antibodies (RFFIT and FAVN). A number of different variants of enzyme-linked immunosorbent assay have been developed, and methods have been proposed for the determination of anti-rabies virus-neutralizing antibodies in low-quality samples, including hemolytic thoracic fluid. In addition to the widely used methods, alternative methods for determining antibodies to rabies virus are proposed, which provide for both the qualitative determination of the protective titer of antibodies to the virus (for example, using test strips) and the quantitative determination of titers using high-precision methods such as flow cytometry.

Keywords: rabies, intravital diagnosis, antibody detection, virus-neutralization reaction, enzyme immunoassay.

Address:

Lobanova V.A.

Postgraduate student of the Department of Immunology of the All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry

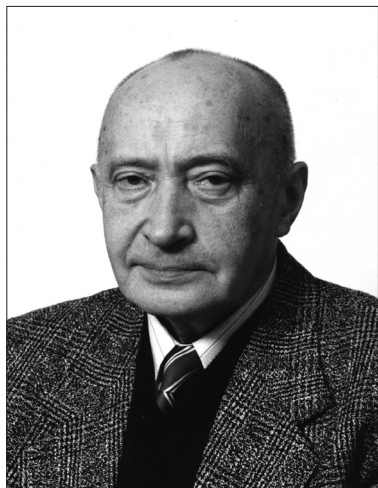
E-mail: varvara.ustinova1995@gmail.com

Для цитирования:

В.А. Лобанова, В.И. Ключкина. Биотехнологические аспекты совершенствования методов выявления антител к вирусу бешенства животных. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2021; 17(1):62–75.

For citation:

V.A. Lobanova, V.I. Klyukina. Biotechnological aspects of improving detection methods antibodies to animal rabies virus. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2021; 17(1):62–75 (in Russian).



**Памяти члена-корреспондента РАН
Л.В. Калакуцкого (1932–2020)**

8 ноября 2020 года скончался Лев Владимирович Калакуцкий — крупный микробиолог, член-корреспондент РАН. Он родился 11 мая 1932 года в Москве. В 1955 г. Л.В. Калакуцкий окончил биолого-почвенный факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, после чего трудился в течение 20 лет в Институте микробиологии АН СССР, пройдя путь от лаборанта до заведующего лабораторией. Здесь же им были выполнены кандидатская и докторская диссертации, посвященные биологии актиномицетов. Является учеником Н.А. Красильникова, авторитетного ученого-микробиолога.

С 1976 года начался пуцзинский период его деятельности: он был приглашен директором Института биохимии и физиологии микроорганизмов (ИБФМ) АН СССР академиком Г.К. Скрыбиным на работу в это учреждение. Здесь в наибольшей степени проявились его уникальные черты характера, свойственные незаурядной личности.

В соответствии с академическими традициями он продолжил главное направление своих научных исследований, нацеленное на изучение разнообразия микроорганизмов, преимущественно актиномицетов. В данной предметной области им был выделен и детально описан ряд новых видов и родов этой группы микроорганизмов, получены основополагающие результаты об их биологии, экологии, физиологии, изменчивости и циклах развития. Указанный комплекс работ был удостоен в 1983 г. премии им. С.Н. Виноградского АН СССР. В 1987 году он был избран членом-корреспондентом АН СССР.

Л.В. Калакуцкий является автором более 250 опубликованных работ. Им подготовлено 5 докторов и 20 кандидатов наук.

Все перечисленное характеризует итог обычного жизненного пути научного работника, преданно, последовательно и добросовестно реализовавшего свои намерения в избранной области исследований. Но у Льва Владимировича есть еще важная заслуга перед отечественной микробиологией — это становление коллекционного дела в стране. В 1970-х годах он вместе с группой единомышленников выступил с инициативой возрождения Всесоюзной коллекции микроорганизмов (ВКМ). В течение почти четверти века (1980–2003 гг.) Л.В. Калакуцкий руководил отделом «Всероссийская коллекция микроорганизмов», входившим в состав Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН. Профессионализм и высокие организаторские способности позволили ему обеспечить выход на международный уровень и установить результативные контакты со специалистами ведущих мировых коллекций. Он принял участие в формировании и деятельности, начиная с 1981 г., Европейской организации коллекций культур (ЕССО). Больше того, в 1988 году его избрали Президентом ЕССО (он занимал этот пост до 1993 г.). К числу существенных достижений в коллекционной работе следует отнести публикацию первого Указателя (Каталога) видов микроорганизмов, поддерживаемых в 37 коллекциях, включая коллекции различных республик СССР и ряда стран социалистического лагеря. При этом для вошедших в этот целевой проект коллекций СЭВ был разработан единый стандарт и единый инструментарий информационной системы, создана общая база данных. Каталоги ВКМ и ряда других российских коллекций были позднее интегрированы в Глобальный каталог Всемирного центра данных о микроорганизмах (WDCM). Начиная с 2009 года, Л.В. Калакуцкий руководил работой коллектива ВКМ в международных проектах, в том числе по созданию Глобальной сети биологических ресурсных центров (GBRCN) и Пан-европейской распределенной инфраструктуры микробных ресурсов (MIRRI).

В общем, нужно подчеркнуть, что он как цельный, эрудированный специалист достойно представлял российскую науку в международном масштабе. Это был человек на своем месте, без комплекса ложности положения — нередкой участи широкой русской души.

Ясно, что столь заметный вклад в общее коллекционное дело не мог остаться незамеченным научной общественностью. Он выполнял, как уже упоминалось, обязанности Президента Европейской организации коллекций культур, вице-президента Всесоюзного микробиологического общества, эксперта от Российской

Федерации в составах рабочих групп Организации по экономическому сотрудничеству и развитию (ОЭСР) по вопросам биобезопасности и доступа к генетическим ресурсам в рамках реализации положений Конвенции о биологическом разнообразии, работал в составе комитетов Всемирной организации коллекций культур и Подкомитета по таксономии актиномицетов Международного комитета по систематике прокариот (ICSP), был членом экспертного совета РФФИ по физико-химической биологии, руководителем Рабочей группы по выработке концепции Биологических ресурсных центров в России при Межведомственной комиссии по генно-инженерной деятельности.

Л.В. Калакуцкий состоял членом редколлегии ряда ведущих российских и зарубежных изданий: журналов «Микробиология», «Успехи современной биологии», «FEMS Microbiology Reviews», «FEMS Microbiology Letters», «Cytology» и др. Был также экспертом РАН, членом ученых советов ИБФМ РАН и других учреждений.

Он читал курсы лекций на кафедре биологии почв в МГУ им. М.В. Ломоносова и Пущинском государственном университете (ныне — Пущинский естественно-научный институт), был членом диссертационного совета при Институте микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, на протяжении многих лет выполнял обязанности председателя диссертационного совета ИБФМ РАН. Долгое время он был первым проректором по научным вопросам Пущинского государственного университета — первого отечественного вуза, созданного в 1992 г. по Постановлению Правительства РФ на базе институтов РАН.

Глубокое вхождение в биологическую систематику позволило ученому значительно расширить горизонты собственных представлений о роли микрофлоры в современном мире и микробиологии в целом, о чем он так содержательно заявил на Первом российском микробиологическом конгрессе в Пущино в октябре 2017 года: «На международном уровне это просто ренессанс. Говорили о золотом веке микробиологии, относя его к концу 19 века, потом был период интенсивного, но более скрытого развития, а последнее десятилетие, можно сказать, что это ренессанс, потому что открыт, действительно, океан микробов, в котором мы с вами живем, и количество вопросов, задач и возможностей увеличилось на порядок».

Специально надо отметить деятельность Л.В. Калакуцкого в структуре Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, особенно в начальном периоде его формирования. Он способствовал успеш-

ному проведению научных конференций Общества на базе ИБФМ РАН, состоял членом редакционного совета журнала «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова», напечатал в нем обстоятельные статьи (например, в 2006 и 2011 годах). Конечно, незабываемо и чувство юмора Льва Владимировича, который по достоинству ценил обладателей такой черты интеллекта и сам был наделен ею в достаточной степени.



Л.В. Калакуцкий среди участников Первого российского микробиологического конгресса. Пущино, октябрь 2017 г.

Память об этом интересном, колоритном человеке будет сохраняться у всех, близко общавшихся с ним. Редколлегия и редсовет журнала выражают искреннее соболезнование родным, ученикам и близким ученого.

Хотелось бы обратить внимание специалистов на важную работу Л.В. Калакуцкого «Биоразнообразие и доступ к генетическим ресурсам: анализ проблемы и прогноз», опубликованную в «Вестнике биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» (2006, Т. 2, № 1, с. 63–68), в которой он подчеркивает недостаточно полную изученность микроорганизмов и значительную неизведанность мира прокариот по сравнению с ядродержащими живыми существами.

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2021 ГОДА*

СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

1881 — Луи Пастер получил первые вакцины против куриной холеры.

1881 — введение термина «митоз» немецким цитологом Вальтером Флемингом (1843–1905).

1911 — Т.Х. Морган в опытах на дрозофиле обнаружил связь между конкретными генами и конкретными хромосомами.

1911 — открытие Раусом вируса саркомы.

1921 — Г. Меллер в лаборатории Т.Х. Моргана обнаружил способность фагов и генов к размножению, то есть к самовоспроизведению.

1931 — Б. Мак-Клинток и Х. Крейтон в экспериментах на кукурузе доказали, что в основе рекомбинации лежит кроссинговер.

1941 — американские генетики Дж. Бидл и Э. Тейтем предложили гипотезу «один ген — один фермент».

1941 — первое употребление термина «генетическая инженерия».

1946 — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине Герману Меллеру за открытие возникновения мутаций под действием рентгеновских лучей.

1956 — Артур Корнберг выделил ДНК-полимеразу (за это вместе с Северо Очоа был удостоен Нобелевской премии в 1959 г.).

1961 — открытие генетического кода: М. Ниренберг вместе с Г. Маттеи обнаружили первый триплет из полиурацила, кодирующий фенилаланин.

1966 — полная расшифровка генетического кода.

1971 — американские исследователи С. Козн и Г. Бойер независимо друг от друга разработали методы переноса гена из одного организма в другой (начало генной инженерии).

1981 — картирование гена инсулина (Harper M. et al.).

1981 — появление на рынке первых диагностикумов на основе моноклональных антител (США).

1986 — начало обсуждения проекта «Геном человека».

1996 — определение полной нуклеотидной последовательности генома пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

2001 — публикация генома человека в «Science» и «Nature».

ПЕРСОНАЛИИ

140 лет со дня рождения Александра Флеминга (1881–1955), шотландского микробиолога, первооткрывателя пенициллина, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1945).

120 лет со дня рождения Лайнуса Полинга (1901–1994), американского химика, дважды лауреата Нобелевской премии.

110 лет со дня рождения датско-английского иммунолога Нильса К. Йерне (1911–1994), лауреата Нобелевской премии 1984 года (совместно с Г. Келером и С. Мильштейном).

100 лет со дня рождения Ирины Николаевны Блохиной (1921–1999), академика РАН, отечественного микробиолога.

90 лет со дня рождения Александра Сергеевича Спирина (1931–2020), отечественного биохимика, академика РАН.

90 лет со дня рождения и 10 лет со дня смерти Николая Павловича Бочкова (1931–2011), отечественного медицинского генетика, академика РАН.

80 лет со дня рождения Владимира Олеговича Самойлова (род. в 1941 г.), отечественного биофизика, члена-корреспондента РАН.

* Материал подготовлен В.С. Воробьевым

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 круглых 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 30.03.2021
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 5,0. Тираж 1000 экз.

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