

**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

**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

**СОДЕРЖАНИЕ**

**Колонка главного редактора**

К читателям. *Р.Г. Василев* ..... 5

**Оригинальные статьи**

- Влияние деминерализованного костного матрикса на биохимические показатели культур клеток.  
*Л.Р. Валиуллин, А.И. Самсонов, Риш.С. Мухаммадиев, И.С. Рагинов,  
П.П. Муковоз, Н.Р. Касанова* ..... 6
- Ген холодового шока *csh1* у *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139.  
*С.О. Водопьянов, О.В. Бородина, М.И. Ежова, И.П. Олейников, А.С. Водопьянов, А.К. Носков* ..... 12
- Применение методов математического планирования при изучении влияния ростостимулирующих добавок на рост *Yersinia pseudotuberculosis*.  
*Р.Р. Салихов, О.А. Волох, А.К. Никифоров* ..... 20
- Накопление электрического заряда в батарее на основе белков и электропроводящих гидрогелей.  
*Е.А. Боброва, П.М. Готовцев, М.С. Аксёнова, Ю.М. Парунова, Р.Г. Василев* ..... 27
- Экспериментальное моделирование биопленок *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогруппы на пластиковом субстрате материала медицинской маски.  
*С.В. Титова, Е.А. Меньшикова, С.О. Водопьянов, И.П. Олейников,  
О.В. Бородина, Н.А. Селянская* ..... 32

**Обзоры**

- Регуляция экспрессии гена *Sox2* транскрипционными факторами в нейрональных стволовых клетках.  
*Е.В. Лаптенкова, П.М. Готовцев, Р.Г. Василев* ..... 39
- Бактериальные внеклеточные везикулы для новых технологий в биомедицине: проблемы и перспективы.  
*В.М. Чернов, А.А. Музыкантов, Н.Б. Баранова, О.А. Чернова* ..... 48
- Современный обзор производства диагностических и лечебно-профилактических бактериофагов.  
*Ю.В. Сиягина, М.В. Овчинникова, О.С. Зинина, К.С. Гумаюнова, А.К. Никифоров* ..... 62
- Эффективные средства в борьбе с холерой в эпоху антибиотикорезистентности.  
*О.Ф. Кретенчук, М.В. Полеева, В.А. Коршенко, Е.И. Марковская, О.С. Чемисова* ..... 72
- Современные аспекты лабораторной диагностики острых кишечных инфекций, вызванных представителями рода *Salmonella* (обзор литературы).  
*С.А. Иванов, Д.И. Симакова, И.Р. Симонова, А.В. Евтеев, Н.Е. Гаевская* ..... 83
- Методические подходы к контролю эффективности систем очистки биологических аэрозолей в биотехнологических процессах (обзор литературы).  
*А.В. Комиссаров, О.А. Волох, К.М. Морозов, А.К. Никифоров* ..... 93

**Краткие сообщения**

- Перспективы расширения ассортимента бактериальных штаммов-компонентов средств защиты растений биологического происхождения.  
*Н.С. Ляховченко, В.Ю. Сенченков, И.А. Никишин, И.П. Соляникова* ..... 103
- Пищевая ценность съедобных грибов в аспекте степени перевариваемости их белков и развитие методов изучения перевариваемости белков.  
*А.Н. Разин, М.Ю. Волков, А.В. Гарабаджиу* ..... 107

**Правила для авторов** ..... 111

**CONTENTS**

**Column of the editor-in-chief**

To readers. R.G. Vasilov ..... 5

**Original articles**

Effect of demineralized bone matrix on biochemical parameters of cell cultures.

*L.R. Valiullin, A.I. Samsonov, Rish.S. Mukhammadiev, I.S. Raginov,*

*P.P. Mukovoz, N.R. Kasanova* ..... 6

Cold shock gene *csh1* in *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139.

*S.O. Vodopyanov, O.V. Borodina, M.I. Yezhova, I.P. Oleynikov, A.S. Vodopyanov, A.K. Noskov* ..... 12

Application of mathematical planning methods in studying the influence of growth promoting supplements on the growth of *Yersinia pseudotuberculosis*.

*R.R. Salikhov, O.A. Volokh, A.K. Nikiforov* ..... 20

Electric charge accumulation in a battery based on proteins and electrically conductive hydrogels.

*E.A. Bobrova, P.M. Gotovtsev, M.S. Aksenova, Y.M. Parunova, R.G. Vasilov* ..... 27

Experimental modeling of biofilms of *Vibrio cholerae* O1 and O139 serogroups on a plastic substrate of medical mask material.

*S.V. Titova, E.A. Menshikova, S.O. Vodop'yanov, I.P. Oleynikov,*

*O.V. Borodina, N.A. Selyanskaya* ..... 32

**Reviews**

Regulation of Sox2 expression by transcription factors in neuronal stem cells.

*E.V. Laptenkova, P.M. Gotovtsev, R.G. Vasilov* ..... 39

Bacterial extracellular vesicles for new technologies in biomedicine: problems and prospects.

*V.M. Chernov, A.A. Muzikantov, N.B. Baranova, O.A. Chernova* ..... 48

A modern review of the production of diagnostic and therapeutic bacteriophages.

*Yu.V. Sinyagina, M.V. Ovchinnikova, O.S. Zinina, K.S. Gumayunova, A.K. Nikiforov* ..... 62

Effective means in the fight against Cholera in the era of antibiotic resistance.

*O.F. Kretenchuk, M.V. Poleeva, V.A. Korshenko, E.I. Markovskaya, O.S. Chemisova* ..... 72

Modern aspects of laboratory diagnosis of acute intestinal infections, caused by representatives of the genus *Salmonella* (literature review).

*S.A. Ivanov, D.I. Simakova, I.R. Simonova, A.V. Evteev, N.E. Gaevskaya* ..... 83

Methodological approaches to monitoring the efficiency of biological aerosols purification systems in biotechnological processes (literature review).

*A.V. Komissarov, O.A. Volokh, K.M. Morozov, A.K. Nikiforov* ..... 93

**Short communications**

Prospects for expanding the range of bacterial strains-components of plant protection means of biological origin.

*N.S. Lyakhovchenko, V.Yu. Senchenkov, I.A. Nikishin, I.P. Solyanikova* ..... 103

Nutritional value of edible mushrooms in terms of the degree of digestibility of their proteins and development of methods for studying protein digestibility.

*A.N. Razin, M.Yu. Volkov, A.V. Garabagiu* ..... 107

**Rules for authors** ..... 111

**К читателям**

Рубрика «Оригинальные статьи» четвертого номера журнала за 2022 год содержит 5 работ. Исследование Валиулина Л.Р. (Казань) с коллегами из Московской и Новосибирской областей посвящено разработке новейших материалов, необходимых для проведения реконструктивных хирургических операций. Сотрудниками Ростовского-на-Дону противочумного института (Водопьянов С.О. и др.) было изучено распространение гена холодового шока *csH1* среди холерных эмбрионов попО1/попО139 серогрупп. Салихов Р.Р. и др. (Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов) предложили метод математического планирования с целью оптимизации питательной среды для глубинного культивирования возбудителя псевдотуберкулеза. Боброва Е.В. с группой сотрудников (НИЦ «Курчатовский институт», МФТИ) представили собственную разработку способа накопления электрического заряда в батарее на основе белков и электропроводящих гелей. Титова С.В. вместе с соавторами из Ростовского-на-Дону противочумного института исследовали проблему микробной колонизации пластиковых субстратов с использованием токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* О1 и О139 серогрупп.

В конструкцию номера также включены 6 обзорных статей. Лаптенкова Е.В. и др. (НИЦ «Курчатовский институт», МФТИ) сконцентрировали в своей подборке информацию о результатах и механизмах действия ключевых транскрипционных факторов на экспрессию *Sox2* в нейрональных стволовых клетках. Группа исследователей из Казанского научного центра РАН (Чернов В.М. и др.) провела обстоятельный анализ использования бактериальных внеклеточных везикул в биомедицине. Сиягин Ю.В. и др. (Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов) в обзоре собрали данные по практическому применению бактериофагов в диагностике и лечении инфекционных болезней. Кретенчук О.Ф. с группой соавторов из Ростовского-на-Дону противочумного института обобщили современные сведения об эффективности средств борьбы с холерой в эпоху антибиотикорезистентности. Другая группа из этого же института (Иванов С.А. и др.) подготовила обзор по лабораторной диагностике острых кишечных инфекций, вызванных представителями рода *Salmonella*. Сотрудники саратовских учреждений Комиссаров А.В. и др. (РосНИПЧИ «Микроб», Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова) проанализировали базовую информацию о контроле эффективности систем очистки биологических аэрозолей в биореакторах.

Заключают данный номер журнала два кратких сообщения: Ляховченко Н.С. и др. (Белгород) «Перспективы расширения ассортимента бактериальных штаммов-компонентов средств защиты растений биологического происхождения» и Разин А.М. и др. (Санкт-Петербург) «Пищевая ценность съедобных грибов в аспекте степени перевариваемости их белков и развитие методов изучения перевариваемости белков».

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

## ВЛИЯНИЕ ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КУЛЬТУР КЛЕТОК

Л.Р. ВАЛИУЛЛИН<sup>1,3,4</sup>, А.И. САМСОНОВ<sup>1</sup>, РИШ.С. МУХАММАДИЕВ<sup>1,3</sup>,  
И.С. РАГИНОВ<sup>1</sup>, П.П. МУКОВОЗ<sup>3</sup>, Н.Р. КАСАНОВА<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии», Московская обл.;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»;

<sup>3</sup>ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Казань;

<sup>4</sup>Сибирский федеральный научный центр агроботехнологий РАН, Новосибирская обл.

Создание и разработка новейших биопластических материалов, необходимых для проведения реконструктивных хирургических операций в различных направлениях медицины, остается весьма актуальной и приоритетной задачей в современной биохимии и биотехнологии. Поэтому вопрос безопасности и эффективности применения этих материалов является неотъемлемой частью данных исследований. Для определения биологических свойств деминерализованного костного матрикса использовалась иммортализованная культура клеток легкого эмбриона крупного рогатого скота (линия ЛЭК). Были изучены биохимические показатели линии клеток ЛЭК при воздействии на них деминерализованным костным матриксом в различных концентрациях. Такие показатели, как АЛТ, АСТ, содержание молочной кислоты (Лактат LO-POD), уровень потребления глюкозы клетками и синтез фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) клетками линии ЛЭК, повышались, что свидетельствует о нарушении морфологических и биохимических показателей клеток, особенно при увеличении дозы деминерализованного костного матрикса (2 г).

*Ключевые слова:* биохимия, культуры клеток, костный матрикс, биохимические показатели.

### Введение

В настоящее время реконструктивный характер хирургической помощи населению во многом обусловлен успешным развитием биотехнологий, а также широким применением пластических материалов различного происхождения в реконструктивных операциях [16]. Мировой опыт хирургии постоянно доказывает, что биологические материалы являются одним из важнейших факторов достижения положительного результата восстановительного лечения [7]. Биоимплантаты могут быть альтернативным вариантом в использовании аутоклеток при замещении тканевых дефектов. По мере накопления опыта, связанного с биоимплантологией, процесс создания новых материалов становится все более трудоемким и высокотехнологичным, он сопровождается обязательным

соблюдением клинической безопасности и наличием доказуемой эффективности созданных материалов [1, 2, 8].

Современная биотехнология и имплантология разделяют пластический материал на две основные группы — органические и неорганические материалы. Однако в настоящее время формируется и третья группа, занимающая промежуточное положение, в которую входят материалы на основе ксеногенного коллагена, солей кальция и других соединений [4].

Процесс создания деминерализованных костных аллоимплантатов происходит с помощью декальцинации растворами кислот костной ткани, в результате чего изменяется соотношение органического и минерального компонентов. Тогда материал приобретает не только остеокондуктивные, но и дополнительные остеоиндуктивные свойства. В таком случае деминерализация кости может быть поверхностной, частичной или полной. В зависимости от степени декальцинации материал имеет разные пластические и механические характеристики, что создает хирургу возможность комбинировать материал в зависимости от конкретной клинической ситуации [6]. Разная степень деминерализации и геометрия данных биопластических материалов позволили использовать их во многих областях реконструктивной хирургии, как

© 2022 г. Валиуллин Л.Р., Самсонов А.И., Мухаммадиев Риш.С., Рагинов И.С., Муковоз П.П., Касанова Н.Р.

\* Автор для переписки:

Касанова Надия Радиковна

канд. с.-х. наук, доцент кафедры биохимии, физики и математики Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана

E-mail: nadia-kasanova@mail.ru

для заполнения любых костных дефектов, так и для ускорения процессов остеогенеза [5, 10].

В биотехнологии России активно ведется работа по синтезу биокомпозиционных материалов, содержащих как основные компоненты костной ткани, так и биоактивные субстанции. К таким субстанциям относятся факторы роста, морфогенетические белки и другие компоненты костного матрикса. Биоактивным субстанциям отводят роль активаторов и регуляторов физиологической регенерации тканей [4, 11].

Однако изучение биологической активности имплантатов, независимо от последующей цели их применения, как правило, предполагает оценку их свойств. На сегодняшний день использование методов оценки токсичности с применением культур клеток находит более широкое применение в биохимико-токсикологических исследованиях, чем классические методы с тестами на подопытных животных [3, 12].

Такие методы дают возможность, помимо решения этических проблем, связанных с массовым использованием и гибелью экспериментальных животных, значительно удешевить и сократить сроки предварительного исследования новых химических препаратов, прежде всего, на стадии их доклинических испытаний. Кроме того, использование культур клеток позволяет установить характер биологической активности изучаемых соединений непосредственно на клеточном уровне [9, 13, 14].

Исходя из вышеизложенного, целью работы является изучение биохимических показателей культур клеток при воздействии деминерализованного очищенного костного матрикса.

### Материалы и методы

Для изучения биологических свойств деминерализованного костного матрикса (ДКМ) использовалась иммортализованная культура клеток легкого эмбриона крупного рогатого скота (линия ЛЭК). Клетки культивировались в среде ДМЕМ в присутствии 10% фетальной телячьей сыворотки при +37 °С и 5% CO<sub>2</sub>. Препараты растворялись в смеси ДМСО и 96% спирта в соотношении (1:1). Исследуемый деминерализованный костный матрикс был разделен на несколько групп:

- первая группа служила отрицательным контролем, где содержится среда ДМЕМ в присутствии 10% фетальной телячьей сыворотки без культур клеток ЛЭК;
- вторая группа служила контролем с добавлением клеток ЛЭК, без добавления костной ткани;

- третья группа получала 100 мг/л деминерализованного костного матрикса;
- четвертая группа — 300 мг/л;
- пятая группа — 500 мг/л;
- шестая группа — 700 мг/л;
- седьмая группа — 1000 мг/л;
- восьмая группа — 1500 мг/л;
- девятая группа — 1700 мг/л;
- десятая — 2000 мг/л.

Исследуемое вещество добавляли в среду для культивирования клеток.

В исследованиях определялись такие показатели, как активность фермента аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ), содержание молочной кислоты (Лактат LO-POD), уровень потребления глюкозы клетками и синтез фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) клетками линии ЛЭК.

### Результаты

Изучение биохимических показателей линии клеток ЛЭК при воздействии деминерализованного костного матрикса представлено в таблице 1.

Таблица 1

#### Изучение биохимических показателей линии клеток ЛЭК при воздействии деминерализованного костного матрикса

Группа исследований	АЛТ, Ед/л	АСТ, Ед/л	Лактат LO-POD, г/л
1	9,4±0,32	15,2±1,46	0,197±0,27
2	10,1±0,32	16,3±1,59	0,428±0,24*
3	10,0±0,33	15,9±1,60	0,372±0,26*
4	10,6±0,32	16,4±1,52	0,351±0,22*
5	11,0±0,35*	16,9±1,50	0,350±0,21*
6	10,9±0,34*	16,9±1,48	0,351±0,22*
7	11,3±0,38*	17,2±1,46	0,349±0,25*
8	13,1±0,33*	18,3±1,50	0,346±0,27*
9	14,5±0,31*	19,4±0,51	0,331±0,24*
10	16,3±0,35*	20,9±1,48*	0,294±0,28*

Примечание: \* — различия с контролем достоверны с точностью  $p \leq 0,05$

Из таблицы 1 видно, что во второй группе уровень АЛТ повысился на 10,6% по сравнению с контролем, в третьей группе — на 6%, в четвертой группе — на 12%, в пятой группе — на 17%, в шестой группе — на 16%, в

седьмой группе — на 20%, в восьмой, девятой и десятой группах — на 39, 54 и 73% соответственно.

Активность АСТ в питательной среде во второй группе увеличилась на 7%, в третьей группе в эксперименте повышение было незначительным. В четвертой группе содержание АСТ увеличилось на 8% по сравнению с контрольной группой. В пятой и шестой группах активность АСТ повысилась на 11% в сравнении с контролем. Количество АСТ в седьмой и восьмой группах повысилось на 13 и 14%, соответственно. В девятой и десятой группах активность фермента АСТ возросла на 27 и 38%, соответственно.

Содержание молочной кислоты (Лактат LО-РOD) во второй группе увеличилось на 117% в сравнении с контрольной группой. В третьей, четвертой и пятой группах уровни содержания молочной кислоты повысились на 88, 78, и 77% соответственно. В шестой, седьмой и восьмой группах уровни молочной кислоты в культуральной среде повысились соответственно на 77, 73 и 75% по сравнению с контрольной группой. В девятой и десятой группах данный показатель возрос на 62 и 49%, соответственно.

Результаты изучения потребления глюкозы клетками линии ЛЭК при воздействии ДКМ представлены на рисунке 1.

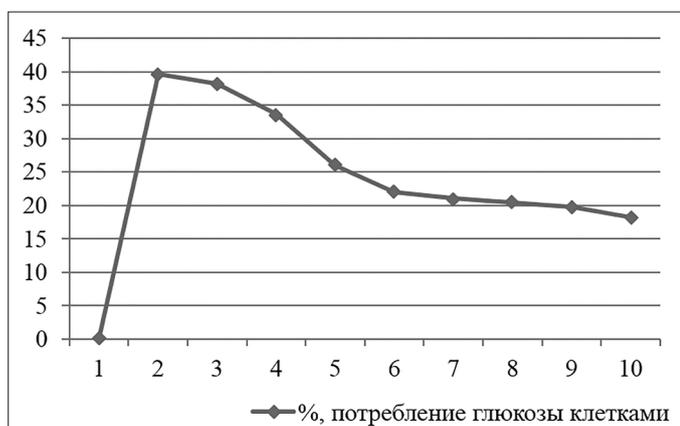


Рис. 1. Изучение потребления глюкозы клетками линии ЛЭК при воздействии ДКМ, %

Уровень потребления глюкозы во второй группе составил 40%. В третьей, четвертой и пятой группах — 38, 33 и 26%, соответственно. В шестой, седьмой и восьмой группах данный показатель был равен соответственно 22, 21 и 20,4%. В девятой и десятой группах потребление глюкозы клетками составило 19,8 и 18,2%.

Результаты исследования синтеза фермента ЛДГ клетками линии ЛЭК при воздействии ДКМ приведены на рисунке 2.

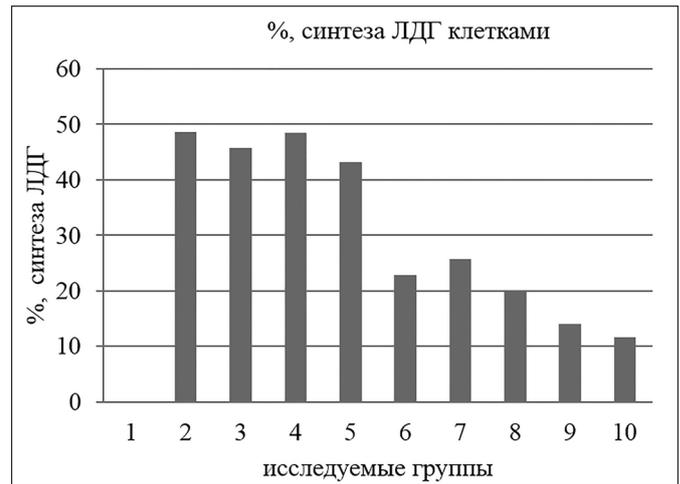


Рис. 2. Исследование синтеза фермента ЛДГ клетками линии ЛЭК при воздействии ДКМ, %

Из рисунка 2 видно, что уровень синтеза ЛДГ во второй группе повысился на 48% по сравнению с контрольной группой. В третьей, четвертой и пятой группах синтез ЛДГ увеличился на 45, 48 и 43%, соответственно. В шестой, седьмой и восьмой группах уровень синтеза ЛДГ клетками был выше соответственно на 23, 25 и 20% в сравнении с контрольной группой. В девятой и десятой группах синтез фермента ЛДГ клетками был выше только на 13 и 11%, соответственно.

## Заключение

Воздействие деминерализованного костного матрикса на клетки млекопитающих (линии клеток легкого эмбриона крупного рогатого скота) в течение 24 часов вызывает нарушение морфологических и биохимических показателей клеток, особенно при увеличении дозы деминерализованного костного матрикса (2 г), проявляющееся повышением АЛТ на 73%, АСТ — на 38%. Воздействие деминерализованного костного матрикса в самой большой дозе вызывало повышение синтеза клетками молочной кислоты на 49%. При воздействии ДКМ на культуру клеток наблюдалось подавление потребления клетками глюкозы — до 18,2%.

Проведенные исследования указывают на то, что при повышении дозы деминерализованного костного матрикса более 2 грамм происходят значительные изменения биохимических показателей в клеточных линиях ЛЭК; следовательно, возможно его использование в количествах не более рекомендуемых доз.

*Благодарность: работа выполнена в рамках гранта № 075-15-2022-1138.*

## Литература

1. Валиуллин Л.Р., Идиятов И.И., Егоров В.И., Набатов А.А., Галлямова С.Р., Рагинов И.С., Лекишвили М.В., Никитин А.И. Изучение цитотоксических свойств остеопластических материалов на основе деминерализованной костной ткани // Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии / Сборник тезисов VII Всероссийского симпозиума с международным участием. — 2017. — С. 128–130.
2. Валиуллин Л.Р., Галлямова С.Р., Бионьшев-Абрамов Л.Л., Рагинов И.С., Никитин А.И. Костнопластические материалы в травматологии и ортопедии // Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии / Сборник тезисов VII Всероссийского симпозиума с международным участием. — 2017. — С. 39–42.
3. Касанова Н.Р., Валиуллин Л.Р., Мухаммадиев Рин.С., Глинушкин А.П., Шамсутдинова Н.В. Изучение биохимических показателей клеток при воздействии зевралена и T-2 токсина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2022. — Т. 18. — № 1. — С. 28–32.
4. Валиуллин Л.Р., Бирюля В.В., Идиятов И.И., Касанова Н.Р., Набатов А.А. Изучение изменений биохимических показателей культур клеток при воздействии T-2 токсина // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. — 2018. — Т. 236. — № 4. — С. 39–43.
5. Колсанов В.С., Максудов Р.Н., Аляев В.А., Рагинов И.С., Валиуллин Л.Р. Получение высокоочищенного композитного материала для замещения дефектов кости в среде сверхкритического флюида / Тезисы докладов IX Научно-практическая конференция с международным участием. Сверхкритические флюиды (СКФ): фундаментальные основы, технологии, инновации. — 2017. — С. 493–495.
6. Лекишвили М.В., Родионова С.С., Ильина В.К. Основные свойства деминерализованных аллоимплантатов, изготавливаемых в тканевом банке ЦИТО // Вестник травматологии и ортопедии. — 2007. — № 3. — С. 80–86.
7. Лекишвили М.В. Технологии изготовления костного пластического материала для применения в восстановительной хирургии: Дисс. ... докт. мед. наук. — М., 2005.
8. Рагинов И.С., Егоров В.И., Валиуллин Л.Р., Грабовский С.А., Муринов Ю.И., Лекишвили М.В. Влияние производных пиримидина на регенерацию костной ткани // Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии / Сборник тезисов VII Всероссийского симпозиума с международным участием. — 2017. — С. 160–161.
9. Рагинов И.С., Штырлин Ю.Г., Бурмистров М.В., Сафин И.Р., Иксанова А.Г., Егоров В.И., Валиуллин Л.Р., Бадеев Ю.В. Способ оценки эффективности воздействия химиотерапевтических препаратов ксенотрансплантатной модели IN VIVO. Патент на изобретение RU 2638285 С, 12.12.2017. Заявка № 2016134112 от 19.08.2016.
10. Сидорин Г.И., Фролова А.Д., Луковникова Л.В. Об «альтернативных» методах исследования в токсикологии / Тезисы докладов 1 съезда токсикологов России. — М., 1998. — 317 с.
11. Снетков А.И., Лекишвили М.В., Касымов И.А. Использование пластического материала «Перфоост» в клинике детской костной патологии // Вестник травматологии и ортопедии. — 2003. — № 4. — С. 74–79.
12. Щепкина Е.А., Кругляков П.В., Соломин Л.Н. и др. Трансплантация аутологичных мезенхимальных стволовых клеток на деминерализованном костном матриксе при пластике ложных суставов и костных дефектов / Материалы III Всероссийского симпозиума с межд. участием. Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии. — М., 2007. — 113 с.
13. Clemendson C., McFarlane-Abdulla E., Anderson M. et al. MEIC Evaluation of Acute Systemic Toxicity // ATLA. — 2002. — Vol. 24. — Suppl. — P. 251–311.
14. Fentem J., Briggs D. A prevalidation study on in vitro test for acute skin irritation — results and evaluation by the Management Team // Toxicology in vitro (An international journal published in association with TNO BIBRA International LTD. — Pergamon). — 2001. — Vol. 15. — No. 1. — P. 57–93.
15. Horn T., Brien T., Schook L., Rutherford M. Acute hepatotoxicant exposure induces TNFR — mediated hepatic injury and cytokine/apoptotic gene expression // Toxicol. Sci. — 2000. — Vol. 54. — No. 1. — P. 262–273.
16. Hornyak I., Madacsi E., Kalugyer P. et al. Increased release time of antibiotics from bone allografts through a novel biodegradable coating // Biomed. Res. Int. — 2014. — Vol. 2014. — Art. 459867. doi: 10.1155/2014/459867.

## References

1. Valiullin LR, Idiyatov II, Yegorov VI, Nabatov AA, Gallyamova SR, Raginov IS, Lekishvili MV, Nikitin AI. Izucheniye tsitotoksicheskikh svoystv osteoplasticheskikh materialov na osnove demineralizovannoy kostnoy tkani. Aktual'nyye voprosy tkanevoy i kletochnoy transplantologii. Sbornik tezisov VII Vserossiyskogo simpoziuma s mezhdunarodnym uchastiyem 2017: 128–130 (in Russian).
2. Valiullin LR, Gallyamova SR, Bionyshev-Abramov LL, Raginov IS, Nikitin AI. Kostnoplachesticheskiye materialy v travmatologii i ortopedii. Aktual'nyye voprosy tkanevoy i kletochnoy transplantologii. Sbornik tezisov VII Vserossiyskogo simpoziuma s mezhdunarodnym uchastiyem 2017: 39–42 (in Russian).
3. Kasanova NR, Valiullin LR, Muhammadiev RinS, Glinushkin AP, Shamsutdinova NV. Izucheniye biokhimicheskikh pokazateley kletok pri vozdeystvii zevralena i T-2 toksina. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii imeni YuA Ovchinnikova 2022; 18(1):28–32 (in Russian).
4. Valiullin LR, Biryulya VV, Idiyatov II, Kasanova NR, Nabatov AA. Izucheniye izmeneniy biokhimicheskikh pokazateley

- kul'tur kletok pri vozdeystvii T-2 toksina. Uchenyye zapiski Kazanskoj gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im NE Baumana 2018; 236(4):39–43 (in Russian).
5. Kolsanov VS, Maksudov RN, Alyayev VA, Raginov IS, Valiullin LR. Polucheniye vysokoochishchennogo kompozitnogo materiala dlya zameshcheniya defektov kosti v srede sverkhkriticheskogo flyuida. Tezisy dokladov IX Nauchno-prakticheskaya konferentsiya s mezhdunarodnym uchastiyem. Sverkhkriticheskiye flyuidy (SKF): fundamental'nyye osnovy, tekhnologii, innovatsii 2017: 493–495 (in Russian).
  6. Lekishvili MV, Rodionova SS, Il'ina VK. Osnovnyye svoystva demineralizovannykh alloimplantatov, izgotavlivayemykh v tkanevom banke TSITO. Vestnik travmatologii i ortopedii 2007; 3:80–86 (in Russian).
  7. Lekishvili MV. Tekhnologii izgotovleniya kostnogo plasticheskogo materiala dlya primeneniya v vosstanovitel'noy khirurgii: Diss ... dokt med nauk. Moscow, 2005 (in Russian).
  8. Raginov IS, Yegorov VI, Valiullin LR, Grabovskiy SA, Murinov YuI, Lekishvili MV. Vliyaniye proizvodnykh pirimidina na regeneratsiyu kostnoy tkani. Aktual'nyye voprosy tkanevoy i kletochnoy transplantologii. Sbornik tezisov VII Vserossiyskogo simpoziuma s mezhdunarodnym uchastiyem 2017: 160–161 (in Russian).
  9. Raginov IS, Shtyrlin YuG, Burmistrov MV, Safin IR, Iksanova AG, Egorov VI, Valiullin LR, Badeev YuV. Sposob otsenki effektivnosti vozdeystviya khimioterapevticheskikh preparatov ksenotransplantatnoy modeli IN VIVO. Patent na izobreteniyе RU 2638285 C, 12.12.2017. Zayavka № 2016134112 ot 19.08.2016 (in Russian).
  10. Sidorin GI, Frolova AD, Lukovnikova LV. Ob «al'ternativnykh» metodakh issledovaniya v toksikologii. Tezisy dokladov 1 s"yezda toksikologov Rossii. Moscow, 1998: 317 (in Russian).
  11. Snetkov AI, Lekishvili MV, Kasymov IA. Ispol'zovaniya plasticheskogo materiala «Perfoost» v klinike detskoj kostnoy patologii. Vestnik travmatologii i ortopedii 2003; 4:74–79 (in Russian).
  12. Shchepkina YeA, Kruglyakov PV, Solomin LN i dr. Transplantatsiya autologichnykh mezenkhimal'nykh stvolovykh kletok na demineralizovannom kostnom matrikse pri plastike lozhnykh sustavov i kostnykh defektov. Materialy III Vserossiyskogo simpoziuma s mezhd. uchastiyem. Aktual'nyye voprosy tkanevoy i kletochnoy transplantologii. Moscow, 2007: 113 (in Russian).
  13. Clemendson C., McFarlane-Abdulla E., Anderson M. et al. MEIC Evaluation of Acute Systemic Toxicity. ATLA 2002; 24:251–311.
  14. Fentem J, Briggs D. A prevalidation study on in vitro test for acute skin irritation – results and evaluation by the Management Team. Toxicology in vitro (An international journal published in association with TNO BIBRA International LTD. – Pergamon) 2001; 15(1):57–93.
  15. Horn T, Brien T, Schook L, Rutherford M. Acute hepatotoxicant exposure induces TNFR – mediated hepatic injury and cytokine/apoptotic gene expression. Toxicol Sci 2000; 54(1):262–273.
  16. Hornyak I., Madacsi E., Kalugyer P. et al. Increased release time of antibiotics from bone allografts through a novel biodegradable coating. Biomed Res Int 2014; 2014:459867. doi: 10.1155/2014/459867.

## EFFECT OF DEMINERALIZED BONE MATRIX ON BIOCHEMICAL PARAMETERS OF CELL CULTURES

L.R. VALIULLIN<sup>1,3,4</sup>, A.I. SAMSONOV<sup>1</sup>, RISH.S. MUKHAMMADIEV<sup>1,3</sup>,  
I.S. RAGINOV<sup>1</sup>, P.P. MUKOVOZ<sup>3</sup>, N.R. KASANOVA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> All-Russian Research Institute of Phytopathology, Moscow region;

<sup>2</sup> Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman,

<sup>3</sup> Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan;

<sup>4</sup> Siberian Federal Scientific Center of Agrobiotechnologies, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk Region

The creation and development of the latest bioplastic materials necessary for reconstructive surgical operations in various areas of medicine remains a very urgent and priority task in modern biochemistry and biotechnology. Therefore, the question of the safety and effectiveness of the use of these materials is an integral part of these studies. Immortalized bovine embryo lung cell culture (LEC line) was used to determine the biological properties of the demineralized bone matrix. Biochemical parameters of LEC cell lines were studied when exposed to demineralized bone matrix at various concentrations. Indicators such as ALT, AST, lactic acid content (Lactate LO-POD), glucose consumption by cells and synthesis of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH) by LEC cells increased, which indicates a violation of morphological and biochemical parameters of cells, especially with an increase in the dose of demineralized bone matrix (2 gr.).

*Keywords:* biochemistry, cell cultures, bone matrix, biochemical indices.

**Address:**

Kasanova N.R., Ph.D.

associate professor, department of biochemistry, physics and mathematics,

Kazan State Academy of veterinary medicine named after N.E. Bauman

E-mail: nadia-kasanova@mail.ru

**Для цитирования:**

Валиуллин Л.Р., Самсонов А.И., Мухаммадиев Р.Ш.С., Рагинов И.С., Муковоз П.П., Касанова Н.Р. Влияние деминерализованного костного матрикса на биохимические показатели культур клеток. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(4):6–11.

**For citation:**

Valiullin L.R., Samsonov A.I., Mukhammadiev Rish.S., Raginov I.S., Mukovoz P.P., Kasanova N.R. Effect of demineralized bone matrix on biochemical parameters of cell cultures. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(4):6–11 (in Russian).

ГЕН ХОЛОДОВОГО ШОКА *CSH1* У *VIBRIO CHOLERAE* NONO1/NONO139С.О. ВОДОПЬЯНОВ\*, О.В. БОРОДИНА, М.И. ЕЖОВА,  
И.П. ОЛЕЙНИКОВ, А.С. ВОДОПЬЯНОВ, А.К. НОСКОВ

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

Ранее у нетоксигенного штамма *Vibrio cholerae* O1 20000, выделенного из водоема Ростовской области, был идентифицирован ген холодного шока *csh1*. Целью работы было изучение распространения гена холодного шока *csh1* среди холерных вибрионов nonO1/nonO139 серогрупп, которые широко распространены в природе и рассматриваются как возможные резервуары генов факторов патогенности. Методом анализа *in silico* изучены 955 полногеномных сиквенсов этой группы микроорганизмов, изолированных в различных регионах мира в период 1961–2022 гг. Среди 41 генома токсигенных холерных вибрионов неO1/неO139 (*ctx+*) два содержали *csh1*. При изучении 914 геномов *ctx-* вибрионов установлено, что 140 вибрионов (19,2%) несли ген *csh1*. Самый ранний документированный случай выделения штамма *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 (*csh1+*) зарегистрирован в 1962 году. Из 56 штаммов вибрионов неO1/неO139, изолированных в период 1961–2000 гг., пять культур относились к *csh1+* (8,9%), в то время как за два последующих десятилетия 2001–2020 гг. из 423 культур 102 штамма обладали геном *csh1* (24,1%), что может свидетельствовать о возрастании удельного веса *csh1+* культур в общей популяции *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 и о вероятном их селективном преимуществе, по сравнению со штаммами *csh1-*. В результате ПЦР анализа *in vitro* 159 штаммов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, выделенных из поверхностных водоемов в ходе мониторинга холеры в г. Ростове-на-Дону в 2021 году, обнаружено 111 *csh1+* культур (69,8%). При этом отмечена большая частота выделения *csh1+* культур в сравнительно «холодные» месяцы и ее зависимость от температуры водоема. Результаты INDEL-типирования репрезентативной выборки из 43 штаммов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 свидетельствовали о существовании мажорных *csh1+* INDEL-генотипов, представленных несколькими штаммами. На наш взгляд, штаммы мажорных *csh1+* INDEL-генотипов при низкой температуре воды водоема обладают селективными преимуществами.

**Ключевые слова:** ген холодного шока *csh1*, *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, токсигенные/нетоксигенные холерные вибрионы, ПЦР-анализ, температура воды, INDEL-типирование.

## Введение

Геном возбудителя холеры является чрезвычайно пластичным, поскольку постоянно происходят изменения, приводящие, в том числе, к формированию штаммов с повышенной вирулентностью. Помимо точечных мутаций в различных генах, отмечены различные виды делеций [6, 7, 22]. Кроме того, одна из форм изменчивости вибрионов заключается в приобретении путем горизонтального переноса новых генетических структур Integrative Conjugative Elements (ICEs), представляющих собой мобильные генетические элементы размером от 79 до 108 тысяч пар нуклеотидов, способных интегриро-

ваться в состав хромосомы хозяина и далее передаваться путем конъюгации. Данные ретроспективного анализа, проведенного разными группами авторов, показали, что вибрионы ориентировочно приобрели ICE элемент путем горизонтального переноса от гетерологичных микроорганизмов в период 1978–1984 годов [12, 22].

Для большинства территорий Российской Федерации, в отличие от традиционно эндемичных по холере регионов, характерна низкая температура осенне-зимнего периода, что не способствует длительному выживанию возбудителя в объектах внешней среды. Установлено, что одним из универсальных механизмов адаптации микроорганизмов к холодному фактору служит продукция белков холодного шока [10]. Поэтому механизмы, обуславливающие устойчивость холерных вибрионов к низким температурам, явились объектом изучения разных групп исследователей [5, 11, 13]. Показано существование у холерных вибрионов двух белков холодного шока, кодируемых генами *cspA* и *cspV*, причем эти генетические структуры присутствовали у токсигенных и нетоксигенных штаммов [13].

© 2022 г. Водопьянов С.О., Бородина О.В., Ежова М.И., Олейников И.П., Водопьянов А.С., Носков А.К.

\* Автор для переписки:

Водопьянов Сергей Олегович  
доктор медицинских наук, главный научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других ОКИ, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора  
E-mail: serge100v@gmail.com

Холерные вибрионы nonO1/nonO139 известны как естественные обитатели открытых водоемов и как возбудители острых кишечных инфекций. Они постоянно выделяются из водных объектов при мониторинге холеры [1, 6]. Будучи лучше, по сравнению с *V. cholerae* O1, приспособленными к персистенции в объектах окружающей среды даже в условиях умеренного климата, они могут служить природными резервуарами генов факторов патогенности, которые могут передавать другим холерным вибрионам [5, 16, 26].

Данные возбудители также связаны с различными оппортунистическими инвазивными инфекциями человека [8, 17]. Рост заболеваемости, по мнению ряда исследователей, связан с изменением климата [15, 27]. Кроме того, в начале эпидемии на Гаити вибрионы неO1/O139 были единственным возбудителем, выделенным из 21% клинических образцов [15]. Поэтому вполне оправдан интерес к особенностям биологии этих микроорганизмов. Усилия авторов сосредоточены на полногеномном секвенировании [26], разработке способов типирования и анализа популяционного состава [9, 18], а также изучении роли физико-химических факторов внешней среды, способствующих сохранению возбудителя [25] и его распространению на новые территории [23]. Особый интерес вызывают работы по поиску и идентификации новых генов, обуславливающих выживание в неблагоприятных условиях [14, 21, 23].

При изучении нуклеотидной последовательности *ctx- tcp-* штамма *Vibrio cholerae* O1 20000 (GenBank:CP036500.1), выделенного из водоема Ростовской области в 2016 году, в составе второй хромосомы идентифицирован дополнительный ген холодого шока *csh1* [2].

Цель исследования — изучение динамики распространения гена холодого шока *csh1* у холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп различного происхождения по данным анализа *in silico* и *in vitro*.

## Материалы и методы

Для анализа *in silico* использовали локальную базу геномов холерных вибрионов неO1/неO139, созданную на основании данных GenBank и содержащую информацию о полногеномных сиквенсах 955 токсигенных (*ctx+*) и нетоксигенных (*ctx-*) штаммов этой группы микроорганизмов, изолированных в различных регионах мира в период 1961–2022 гг. Свойства штаммов были взяты из описания. Виртуальное INDEL-типирование и наличие гена *csh1* методом *in silico* оценивали с помощью автор-

ского программного обеспечения GeneExpert, PrimerM и VirtualPCR, написанного на языке программирования Java [4].

Для анализа *in vitro* использовали 159 нетоксигенных (*ctx-*) штаммов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, выделенных из поверхностных водоемов в ходе мониторинга холеры в г. Ростове-на-Дону в 2021 году.

Для выявления гена *csh1* в ПЦР использовали авторские праймеры (прямой *acaggttcgggtaagtgggtt* и обратный *ttcacagcctgtagaccctt*). Положительный результат реакции проявлялся в формировании целевого фрагмента массой 182 нуклеотидные пары. Методы выделения ДНК, проведения ПЦР и INDEL-типирования описаны ранее [3, 4].

Статистическую обработку с применением критерия  $\chi^2$ -квадрат Пирсона для произвольных таблиц проводили на онлайн-калькуляторе <https://medstatistic.ru/calculators/calchit.html>.

## Результаты и обсуждение

Для характеристики встречаемости гена холодого шока *csh1* было проведено *in silico* исследование локальной базы всех геномов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 серогрупп (табл. 1), в которую были включены все последовательности локальной базы, даже с неполной информацией о месте и сроке выделения культуры.

Таблица 1

**Наличие гена холодого шока *csh1* в геномах всех штаммов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, представленных в GenBank по результатам анализа *in silico***

Генотип <i>Vibrio cholerae</i>	Всего геномов	<i>csh1+</i>	% <i>csh1+</i>
nonO1/nonO139 <i>ctx+</i>	41	2	~4
nonO1/nonO139 <i>ctx-</i>	914	140	15,3

Среди 41 генома вибрионов nonO1/nonO139 *ctx+* обнаружено два штамма (571-88; N2787), содержащие ген холодого шока *csh1*. Один штамм (571-88) был изолирован в Китае в 1988 году, данные о происхождении второго штамма в описании отсутствовали. Интересно, что оба штамма имели идентичный INDEL-генотип. Не слишком большая выборка штаммов не позволяет сделать вывод о распределении гена холодого шока *csh1* среди nonO1/nonO139 *ctx+* вибрионов.

При изучении 914 геномов nonO1/nonO139 *ctx-* вибрионов (см. табл. 1) установлено, что 140 по-

следовательностей (15,3%) содержали ген холодового шока *csh1*. При поиске возможного «нулевого» предка установлено, что самый ранний случай выделения *csh1+* штамма (10432-62) от пациента с диареей зарегистрирован в 1962 году на Филиппинах. Вторым случаем выделения двух *csh1+* штаммов при отите (VN-00297 и VN-00298) с идентичным INDEL-генотипом был отмечен в Германии в 1995 году. При этом штаммы 1962 и 1995 годов отличались по INDEL-генотипу. Все последующие *csh1+* культуры nonO1/nonO139 *ctx*- вибрионов были выделены в различных регионах мира в XXI веке.

Динамику глобального распространения гена холодового шока *csh1* в популяции *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 изучали на выборке последовательностей с известным сроком и местом выделения культур (табл. 2). С этой целью был рассчитан удельный вес *csh1+* культур в общей популяции. Для получения более информативного результата анализировали штаммы, разбитые по времени выделения на три крупных временных интервала: 1961–2000, 2001–2010 и 2011–2020 гг.

Таблица 2

**Наличие гена холодового шока *csh1* по результатам анализа *in silico* в охарактеризованных геномах штаммов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, в зависимости от срока выделения**

Период выделения, годы	Всего геномов (абс. число)	Количество <i>csh1+</i> геномов (абс. число)	Количество <i>csh1+</i> геномов (в %)
1961–2000 гг.	56	5	8,9
2001–2010 гг.	120	12	10
2011–2020 гг.	303	90	29,7
Всего 1961–2020 гг.	479	107	22,3

Полученные данные свидетельствовали о явном возрастании удельного веса *csh1+* культур в общей популяции *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 с 8,9% в XXI веке до 29,7% в 2011–2020 годах. В целом за два десятилетия XX века (2001–2020 гг.) из 423 культур 102 штамма обладали геном *csh1* (24,1%). Данный факт может отражать селективное преимущество, которое ген холодового шока *csh1* может сообщать вибрионам nonO1/nonO139. Анализ места выделения культур не дал достоверных результатов, поскольку подавляющее большинство культур было изолировано в странах, активно использующих приемы генной диагностики (Германия, США, Россия, Австрия, Китай, Швеция).

Общий удельный вес *csh1+* культур в общей популяции *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 колебался в зависимости от используемой выборки штаммов. Так, в случае общей базы геномов (см. табл. 1), включавшей в том числе последовательности с неполными данными, он составил 15,3%, то среди выборки штаммов с известным сроком и местом изоляции этот показатель вырос до 22,3% (см. табл. 2). Вероятно, штаммы с неясным происхождением были выделены в самый ранний период.

Результаты анализа *in vitro* 159 штаммов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, выделенных из поверхностных водоемов в ходе мониторинга холеры в г. Ростове-на-Дону в 2021 году (табл. 3), свидетельствуют о значительно большей встречаемости *csh1+* культур в «ростовской» популяции (суммарный показатель составил 69,8% по сравнению с 15,3–22,3% в «мировой» выборке. Интересные результаты выявлены при исследовании частоты выявления в зависимости от месяца выделения. Так, в относительно «холодные» периоды (май-июнь) процент *csh1+* культур составил 84,2 и 86,6, в самые жаркие месяцы (июль-август) этот показатель снижался до 53,8 и 64,1%. В этом случае сентябрь 2021 года характеризовался промежуточным итогом – 71,8% *csh1+* культур.

По результатам статистической обработки, значение критерия  $\chi^2$  составляет 12,848, число степеней свободы – 4. Критическое значение  $\chi^2$  составляет 9,488 при уровне значимости  $p \leq 0,05$ ; в нашем случае критерий значимости составил  $p = 0,013$ , соответственно связь является статистически значимой и можно говорить о прямой корреляции между встречаемостью штаммов с геном холодового шока и месяцем выделения культур.

Таблица 3

**Наличие гена холодового шока *csh1* у штаммов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, выделенных в Ростове-на-Дону в 2021 г. из поверхностных водоемов при проведении планового мониторинга холеры**

№ п/п	Месяц	Число культур	культуры <i>csh1+</i>	% <i>csh1+</i> культур
1	май	19	16	84,2
2	июнь	30	26	86,6
3	июль	39	21	53,8
4	август	39	25	64,1
5	сентябрь	32	23	71,8
6	Итого	159	111	69,8

Для дальнейших исследований методом INDEL-типирования из 159 штаммов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 методом случайной выборки отобрали 43

штамма (35 *csh1+* и 8 *csh1-*). Установлено, что для штаммов данной выборки средняя температура воды водоема в момент выделения *csh1+* культур составляла  $22,6 \pm 0,586$  °С, в то время как для *csh1-* штаммов этот показатель составил  $25,12 \pm 1,007$  °С (различия были статистически достоверны ( $p=0,05$ )). В период мониторинга *csh1-* вибрионы выделяли при температуре водоема выше 20 °С, в то время как *csh1+* штаммы выделяли даже при 14 °С и 17 °С. Следовательно, можно предположить, что при высокой температуре могут быть изолированы все попО1/попО139 штаммы, а при температуре водоема ниже 20 °С — только вибрионы с геном холодного шока.

Полученные результаты INDEL-типирования 43 штаммов *Vibrio cholerae* попО1/попО139 (рис. 1) показали, что каждый из 8 *csh1-* штаммов представлял

отдельный INDEL-генотип, равномерно распределенный по итоговой дендрограмме, что свидетельствует о гетерогенности популяции и соответствует данным литературы о высокой гетерогенности данных вибрионов [17, 21]. В это же время 35 *csh1+* штаммов представляли 21 INDEL-генотип. В противовес *csh1-* культурам среди популяции *csh1+* вибрионов выявлено три мажорных INDEL-генотипа, представленных восемью и тремя штаммами (два генотипа). На наш взгляд, штаммы указанных мажорных *csh1+* INDEL-генотипов при низкой температуре водоема обладают селективными преимуществами, что может объяснить их более частое выделение при микробиологическом исследовании; при этом только в одном случае по одному *csh1+* и *csh1-* штамму имели одинаковый INDEL-генотип.

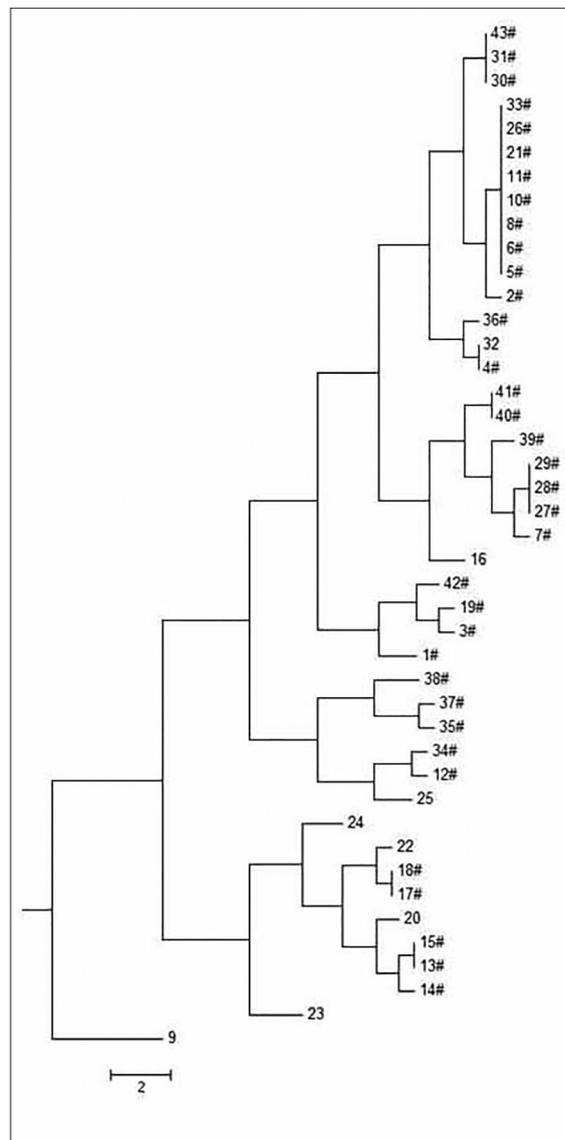


Рис. 1. Дендрограмма распределения INDEL-генотипов 43 штаммов *Vibrio cholerae* попО1/попО139, выделенных в Ростове-на-Дону в 2021 г. из поверхностных водоемов при проведении планового мониторинга холеры. Знаком # отмечены штаммы с геном холодного шока *csh1*

## Заключение

Полученные нами данные свидетельствуют в пользу глобального распространения гена холодового шока *csh1* в популяции *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 в течение последних двух десятилетий. При этом процесс появления *csh1+* культур в популяции *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 резко ускорился и в период 2011–2022 годов уже 29,7% секвенированных штаммов имели данный признак. При изучении распространения гена холодового шока *csh1* в коллекции из 159 штаммов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, выделенных в ходе мониторинга холеры из водоемов г. Ростова-на-Дону в 2021 году. Этим признаком обладали 111 культур (69.8%), что минимум в два раза превышает глобальный показатель. Отмечена также тенденция большего выделения *csh1+* культур в сравнительно прохладные месяцы. В таком случае высокий процент *csh1+* культур в «ростовской» популяции *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 может быть результатом приспособления возбудителя к более низкой температуре и сдвигом популяции в пользу *csh1+* культур. Учитывая, что *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 служат природными резервуарами различных генов, которые могут передавать другим холерным вибрионам, данное обстоятельство может привести к появлению новых клонов патогенных вибрионов, приспособленных к выживанию в водоемах при низких температурах за счет приобретения гена холодового шока *csh1*. По нашему мнению, необходимы дополнительные исследования, направленные на изучение роли гена шока *csh1* в биологии вибрионов.

## Литература

- Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б., Монахова Е.В., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Кругликов В.Д. Генетическая неоднородность популяции *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, циркулирующих в Ростовской области // Здоровье населения и среда обитания. — 2015. — № 3. — С. 25–27.
- Бородина О.В., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Чемисова О.С., Полеева М.В. Изучение встречаемости гена холодового шока *csh1* у штаммов *Vibrio cholerae*, циркулирующих на территории Российской Федерации // Бактериология. — 2021. — Т. 6. — № 3. — С. 22–23.
- Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н. INDEL-типирование штаммов *Vibrio cholerae* // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2017. — Т. 22. — № 4. — С. 195–200.
- Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Писанов Р.В. Выявление штаммов *Vibrio cholerae* «гаитянской» группы с помощью полимеразной цепной реакции на основе INDEL-типирования // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2020. — № 3. — С. 265–270.
- Заднова С.П., Агафонов Д.А., Шашикова А.В., Смирнова Н.И. Сравнительная устойчивость типичных и генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* биовара E1Tor к действию неблагоприятных факторов внешней среды // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2014. — № 2. — С. 11–17.
- Монахова Е.В., Архангельская И.В. Холерные вибрионы неO1/неO139 серогрупп в этиологии острых кишечных инфекций: современная ситуация в России и в мире // Пробл. особо опасных инф. — 2016. — № 2. — С. 14–23.
- Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Кульмань Т.А., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Микроэволюция возбудителя холеры в современный период // Вестник РАМН. — 2014. — № 7–8. — С. 46–53.
- Ahad A., Teryn N., Cerazard R. Septicemia secondary to *Vibrio cholerae* (non-O1/non-O139) in wound // BMJ Case Rep. — 2019. — Vol. 12(10). — e231901. doi: 10.1136/bcr-2019-231901.
- Aydanian A., Tang L., Chen Y., Morris J.G., Jr, Olsen P., Johnson J.A., Nair G.B., Stine O.C. Genetic relatedness of selected clinical and environmental non-O1/O139 *Vibrio cholerae* // Int. J. Infect. Dis. — 2015. — Vol. 37. — P. 152–158.
- Barria M., Malecki C.M. Arraiano Bacterial adaptation to cold // Microbiology (Reading). — 2013. — Vol. 159(Pt 12). — P. 2437–2443.
- Carroll J.W., Mateescu M.C., Chava K., Colwell R.R., Bej A.K. Response and tolerance of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 to cold temperatures // Antonie Van Leeuwenhoek. — 2001. — Vol. 79. — P. 377–384.
- Daliaa A.B., Seed K.D., Calderwood S.B., Camilli A. A globally distributed mobile genetic element inhibits natural transformation of *Vibrio cholerae* // PNAS. — 2015. — Vol. 112. — No. 33. — P. 10485–10490.
- Datta P.P., Bhadra R.K. Cold shock response and major cold shock proteins of *Vibrio cholerae* // Appl. Environ. Microbiol. — 2003. — Vol. 69(11). — P. 6361–6369.
- Fang L., Ginn A.M., Harper J., Kane A.C. Wright Survey and genetic characterization of *Vibrio cholerae* in Apalachicola Bay, Florida (2012–2014) // J. Appl. Microbiol. — 2019. — Vol. 126(4). — P. 1265–1277.
- Hasan N.A., Choi S.Y., Eppinger M., Clark P.W., Chen A., Alam M., Haley B.J., Taviani E., Hine E., Su Q., Tallon L.J., Prosper J.B., Furth K., Hoq M.M., Li H., Fraser-Liggett C.M., Cravioto A., Huq A., Ravel J., Cebula T.A., Colwell R.R. Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2012. — Vol. 109(29). — E2010–E2017. doi: 10.1073/pnas.1207359109.

16. Igere B.E., Okoh A.I., Nwodo U.U. Non-serogroup O1/O139 agglutinable *Vibrio cholerae*: a phylogenetically and genealogically neglected yet emerging potential pathogen of clinical relevance // Arch. Microbiol. — 2022. — Vol. 204(6). — P. 323. doi: 10.1007/s00203-022-02866-1.
17. Jiang F., Bi R., Deng L., Kang H., Gu B., Ma P. Virulence-associated genes and molecular characteristics of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* isolated from hepatitis B cirrhosis patients in China // Int. J. Infect. Dis. — 2018. — Vol. 74. — P. 117–122.
18. Kawai M., Ota A., Takemura T., Nakai T., Maruyama F. Continuation and replacement of *Vibrio cholerae* non-O1 clonal genomic groups isolated from *Plecoglossus altivelis* fish in freshwaters // Environ. Microbiol. — 2020. — Vol. 22(10). — P. 4473–4484.
19. Laviad-Shitrit S., Izhaki I., Halpern M. Accumulating evidence suggests that some waterbird species are potential vectors of *Vibrio cholerae* // PLoS Pathog. — 2019. — Vol. 15(8). — Art. e1007814. doi: 10.1371/journal.ppat.1007814.
20. Lee S.H., Lee H.J., Myung G.E., Choi E.J., Kim I.A., Jeong Y.I., Park G.J., Soh S.M. Distribution of pathogenic vibrio species in the coastal seawater of South Korea (2017–2018) // Osong Public Health Res Perspect. — 2019. — Vol. 10(6). — P. 337–342.
21. Li F., Du P., Li B., Ke C., Chen A., Chen J., Zhou H., Li J., Morris J.G., Jr, Kan B., Wang D. Distribution of virulence-associated genes and genetic relationships in non-O1/O139 *Vibrio cholerae* aquatic isolates from China // Appl. Environ. Microbiol. — 2014. — Vol. 80(16). — P. 4987–4992.
22. Monakhova E.V., Ghosh A., Mutreja A., Weill F.-X., Ramamurthy T. Endemic Cholera in India and Imported Cholera in Russia: What is Common? // Problems of Particularly Dangerous Infections. — 2020. — No 3. — P. 17–26.
23. Mutreja A., Kim D.W., Thomson N.R., Connor T.R., Lee J.H., Kariuki S., Croucher N.J., Choi S.Y., Harris S.R., Lebens M., Niyogi S.K., Kim E.J., Ramamurthy T., Chun J., Wood J.L.N., Clemens J.D., Czerkinsky C., Nair G.B., Holmgren J., Parkhill J., and Dougan G. Evidence for multiple waves of global transmission within the seventh cholera pandemic // Nature. — 2011. — Vol. 477(7365). — P. 462–465.
24. Paul S.S., Takahashi E., Chowdhury G., Miyoshi S-I., Mizuno T., Mukhopadhyay A.K., Dutta S., Okamoto K. Low viability of cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* O1 in the artificial low ionic strength aquatic solution // Biol. Pharm. Bull. — 2020. — Vol. 43(8). — P. 1288–1291.
25. Turner J.W., Duran-Gonzalez J., Laughlin D.A., Unterweger D., Silva D., Ermolinsky B., Pukatzi S., Provenzano D. Draft genome sequences of 13 *Vibrio cholerae* strains from the Rio Grande delta // Microbiol Resour Announc. — 2021. — Vol. 10(22). — Art. e0030821. doi: 10.1128/MRA.00308-21.
26. Vezzulli L., Baker-Austin C., Kirschner A., Pruzzo C., Martinez-Urtaza J. Global emergence of environmental non-O1/O139 *Vibrio cholerae* infections linked with climate change: a neglected research field? // Environ Microbiol. — 2020. — Vol. 22(10). — P. 4342–4355.
27. Wozniak R.A.F., Fouts D.E., Spagnoletti M., Colombo M.M., Ceccarelli D., Garriss G., Dery C., Burrus V., Waldor M.K. Comparative ICE genomics: Insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs // PLoS Genetics. — 2009. — Vol. 5. — Issue 12. — Art. e1000786. doi: 10.1371/journal.pgen.1000786.

## References

1. Arkhangel'skaya IV, Nepomnyashchaya NB, Monakhova YeV, Vodop'yanov AS, Vodop'yanov SO, Kruglikov VD. Geneticheskaya neodnorodnost' populyatsii *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, tsirkuliruyushchikh v Rostovskoy oblasti. Zdorov'ye naseleniya i sreda obitaniya 2015; 3:25–27 (in Russian).
2. Borodina OV, Vodop'yanov SO, Vodop'yanov AS, Oleynikov IP, Chemisova OS, Poleyeva MV. Izucheniye vstrechayemosti gena kholodovogo shoka *csh1* u shtammov *Vibrio cholerae*, tsirkuliruyushchikh na territorii Rossiyskoy Federatsii. Bakteriologiya 2021; 6(3):22–23 (in Russian).
3. Vodop'yanov AS, Vodop'yanov SO, Oleynikov IP, Mishan'kin BN. INDEL-tipirovaniye shtammov *Vibrio cholerae*. Epidemiologiya i infeksionnyye bolezni 2017; 22(4):195–200 (in Russian).
4. Vodop'yanov AS, Vodop'yanov SO, Oleynikov IP, Pisanov RV. Vyyavleniye shtammov *Vibrio cholerae* «gaityanskoy» gruppy s pomoshch'yu polimeraznoy tsepnoy reaktsii na osnove INDEL-tipirovaniya. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 2020; 3:265–270 (in Russian).
5. Zadnova SP, Agafonov DA, Shashkova AV, Smirnova NI. Sravnitel'naya ustoychivost' tipichnykh i geneticheskii izmenennykh shtammov *Vibrio cholerae* biovara ElTor k deystviyu neblagopriyatnykh faktorov vneshney sredy. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 2014; 2:11–17 (in Russian).
6. Monakhova YeV, Arkhangel'skaya IV. Kholernyye vibriony neO1/neO139 serograpp v etiologii ostrykh kishhechnykh infektsiy: sovremennaya situatsiya v Rossii i v mire. Probl osobo opasnykh inf 2016; 2:14–23 (in Russian).
7. Smirnova NI, Agafonov DA, Kul'shan' TA, Krasnov YaM, Kutyrev VV. Mikroevolyutsiya vzbuditelya kholery v sovremennyy period. Vestnik RAMN 2014; 7–8:46–53 (in Russian).
8. Ahad A, Teryn N, Cerazard R. Septicemia secondary to *Vibrio cholerae* (non-O1/non-O139) in wound. BMJ Case Rep 2019; 12(10):e231901. doi: 10.1136/bcr-2019-231901.
9. Aydanian A, Tang L, Chen Y, Morris JG, Jr, Olsen P, Johnson JA, Nair GB, Stine OC. Genetic relatedness of selected clinical and environmental non-O1/O139 *Vibrio cholerae*. Int J Infect Dis 2015; 37:152–158.
10. Barria M, Malecki CM. Arraiano Bacterial adaptation to cold. Microbiology (Reading) 2013; 159(Pt 12):2437–2443.

11. Carroll JW, Mateescu MC, Chava K, Colwell RR, Bej AK. Response and tolerance of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 to cold temperatures. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2001; 79:377–384.
12. Daliaa AB, Seed KD, Calderwood SB, Camilli A. A globally distributed mobile genetic element inhibits natural transformation of *Vibrio cholerae*. *PNAS* 2015; 112(33):10485–10490.
13. Datta PP, Bhadra RK. Cold shock response and major cold shock proteins of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(11):6361–6369.
14. Fang L, Ginn AM, Harper J, Kane AC. Wright Survey and genetic characterization of *Vibrio cholerae* in Apalachicola Bay, Florida (2012–2014). *J Appl Microbiol* 2019; 126(4):1265–1277.
15. Hasan NA, Choi SY, Eppinger M, Clark PW, Chen A, Alam M, Haley BJ, Taviani E, Hine E, Su Q, Tallon LJ, Prosper JB, Furth K, Hoq MM, Li H, Fraser-Liggett CM, Cravioto A, Huq A, Ravel J, Cebula TA, Colwell RR. Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(29):E2010–E2017. doi: 10.1073/pnas.1207359109.
16. Igere BE, Okoh AI, Nwodo UU. Non-serogroup O1/O139 agglutinable *Vibrio cholerae*: a phylogenetically and genealogically neglected yet emerging potential pathogen of clinical relevance. *Arch Microbiol* 2022; 204(6):323. doi: 10.1007/s00203-022-02866-1.
17. Jiang F, Bi R, Deng L, Kang H, Gu B, Ma P. Virulence-associated genes and molecular characteristics of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* isolated from hepatitis B cirrhosis patients in China. *Int J Infect Dis* 2018; 74:117–122.
18. Kawai M, Ota A, Takemura T, Nakai T, Maruyama F. Continuation and replacement of *Vibrio cholerae* non-O1 clonal genomic groups isolated from *Plecoglossus altivelis* fish in freshwaters. *Environ Microbiol* 2020; 22(10):4473–4484.
19. Laviad-Shitrit S, Izhaki I, Halpern M. Accumulating evidence suggests that some waterbird species are potential vectors of *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog* 2019; 15(8):e1007814. doi: 10.1371/journal.ppat.1007814.
20. Lee SH, Lee HJ, Myung GE, Choi EJ, Kim IA, Jeong YI, Park GJ, Soh SM. Distribution of pathogenic vibrio species in the coastal seawater of South Korea (2017–2018). *Osong Public Health Res Perspect* 2019; 10(6):337–342.
21. Li F, Du P, Li B, Ke C, Chen A, Chen J, Zhou H, Li J, Morris JG, Jr, Kan B, Wang D. Distribution of virulence-associated genes and genetic relationships in non-O1/O139 *Vibrio cholerae* aquatic isolates from China. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80(16):4987–4992.
22. Monakhova EV, Ghosh A, Mutreja A Weill F-X, Ramamurthy T. Endemic *Cholera* in India and Imported *Cholera* in Russia: What is Common? *Problems of Particularly Dangerous Infections* 2020; 3:17–26.
23. Mutreja A Kim DW., Thomson NR, Connor TR, Lee JH, Kariuki S, Croucher NJ, Choi SY, Harris SR, Lebens M, Niyogi SK, Kim EJ, Ramamurthy T, Chun J, Wood JLN, Clemens JD, Czerkinsky C, Nair GB, Holmgren J, Parkhill J, and Dougan G. Evidence for multiple waves of global transmission within the seventh cholera pandemic. *Nature* 2011; 477(7365):462–465.
24. Paul SS, Takahashi E, Chowdhury G, Miyoshi S-I, Mizuno T, Mukhopadhyay AK, Dutta S, Okamoto K. Low viability of cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* O1 in the artificial low ionic strength aquatic solution. *Biol Pharm Bull* 2020; 43(8):1288–1291.
25. Turner JW, Duran-Gonzalez J, Laughlin DA, Unterweger D, Silva D, Ermolinsky B, Pukatzki S, Provenzano D. Draft genome sequences of 13 *Vibrio cholerae* strains from the Rio Grande delta. *Microbiol Resour Announc* 2021; 10(22):e0030821. doi: 10.1128/MRA.00308-21.
26. Vezzulli L, Baker-Austin C, Kirschner A, Pruzzo C, Martinez-Urtaza J. Global emergence of environmental non-O1/O139 *Vibrio cholerae* infections linked with climate change: a neglected research field? *Environ Microbiol* 2020; 22(10):4342–4355.
27. Wozniak RAF, Fouts DE, Spagnoletti M, Colombo MM, Ceccarelli D, Garriss G, Dery C, Burrus V, Waldor MK. Comparative ICE genomics: Insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *PLoS Genetics* 2009; 5(Issue 12):e1000786. doi: 10.1371/journal.pgen.1000786.

## COLD SHOCK GENE *CSH1* IN *VIBRIO CHOLERAE* NONO1/NONO139

S.O. VODOPYANOV, O.V. BORODINA, M.I. YEZHOVA,  
I.P. OLEJNIKOV, A.S. VODOPYANOV, A.K. NOSKOV

*Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don*

Previously, the cold shock gene *csH1* was identified in a nontoxigenic strain *Vibrio cholerae* O1 20000 isolated from a reservoir of the Rostov region. The aim of the work was to study the spread of the cold shock gene *csH1* among cholera vibrios nonO1/nonO139 serogroups, which are widespread in nature and are considered as possible reservoirs of genes of pathogenicity factors. The *in silico* analysis method was used to study 955 genome-wide sequences of this group of microorganisms isolated in various regions of the world in the

period 1961–2022. Among 41 genomes of toxigenic cholera vibrios nonO1/nonO139 (*ctx+*), two contained *csh1*. When studying 914 *ctx-* vibrio genomes, it was found that 140 vibrios (19.2%) carried the *csh1* gene. The earliest documented case of isolation of the *Vibrio cholerae* strain nonO1/nonO139 (*csh1+*) was registered in 1962. Of the 56 nonO1/nonO139 vibrio strains isolated in the period 1961–2000, five cultures belonged to *csh1+* (8.9%), while over the next two decades 2001–2020, 102 strains of 423 cultures possessed the *csh1* gene (24.1%), which may indicate an increase in the specific weight of *csh1+* cultures in the general population of *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 and their probable selective advantage, compared with strains of *csh1-*. As a result of in vitro PCR analysis of 159 *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 strains isolated from surface reservoirs during cholera monitoring in Rostov-on-Don in 2021, 111 *csh1+* cultures (69.8%) were detected. At the same time, a high frequency of *csh1+* cultures excretion in relatively «cold» months and its dependence on the temperature of the reservoir were noted. The results of INDEL typing of a representative sample of 43 strains of *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 indicated the existence of major *csh1+* INDEL genotypes represented by several strains. In our opinion, strains of major *csh1+* INDEL genotypes have selective advantages at low water temperature of the reservoir.

**Keywords:** cold shock gene *csh1*, *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, toxigenic/nontoxigenic cholera vibrios, PCR analysis, water temperature, INDEL typing,

**Address:**

Vodopyanov S.O., Ph.D.

chief researcher of the department of microbiology of cholera  
and other regional infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute  
of Rospotrebnadzor

E-mail: serge100v@gmail.com

**Для цитирования:**

Водопьянов С.О., Бородина О.В., Ежова М.И., Олейников И.П., Водопьянов А.С., Носков А.К. Ген холодового шока *csh1* у *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(4):12–19.

**For citation:**

Vodopyanov S.O., Borodina O.V., Yezhova M.I., Oleynikov I.P., Vodopyanov A.S., Noskov A.K. Cold shock gene *csh1* in *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(4):12–19 (in Russian).

## ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ МАТЕМАТИЧЕСКОГО ПЛАНИРОВАНИЯ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ВЛИЯНИЯ РОСТОСТИМУЛИРУЮЩИХ ДОБАВОК НА РОСТ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

Р.Р. САЛИХОВ\*, О.А. ВОЛОХ, А.К. НИКИФОРОВ

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

Методом математического планирования оптимизирована питательная среда для глубинного культивирования возбудителя псевдотуберкулеза. В качестве модельного штамма использован *Y. pseudotuberculosis* 68. Процесс оптимизации состоял из полного факторного эксперимента (ПФЭ 2<sup>3</sup> — полный факторный эксперимент трех факторов на двух уровнях) с последующим движением по градиенту концентрации с целью определения экстремума функции. Оптимизируемый параметр — бактериальная концентрация. Проведено поэтапное масштабирование процесса. В качестве стимуляторов роста, обеспечивающих увеличение прироста биомассы *Y. pseudotuberculosis*, определены дрожжевой экстракт и молибденовоокислый аммоний. Экспериментально установлены концентрации стимуляторов, обеспечивающих увеличение выхода клеточной массы.

**Ключевые слова:** *Yersinia pseudotuberculosis*, штаммы-адсорбенты, глубинное периодическое культивирование, полный факторный эксперимент, стимуляторы роста, математическое планирование.

### Введение

Ранее нами была проведена работа по определению параметров культивирования, поиску питательной среды, углеродной подкормки, обеспечивающих стабильно высокий выход биомассы *Y. pseudotuberculosis*, используемой в производстве чумных диагностических иммуноглобулинов [10]. Дополнительным способом повышения продуктивности культивирования представляется внесение в питательную среду ростостимулирующих добавок.

Проведенный по теме обзор литературы показывает, что имеется информация относительно влияния стимуляторов роста на представителей рода *Yersinia*, однако большая часть исследований ориентируется на ростостимулирующие добавки, используемые в питательных средах для диагностики и культивирования возбудителя чумы [2, 4, 5]. Напротив, применение стимуляторов роста при культивировании *Y. pseudotuberculosis* освещено довольно слабо, имеются сведения о стимулирующем эффекте экзометаболических морских водорослей, некоторых нейромедиаторов [6, 9].

Ввиду близкородственного положения возбудителя чумы и псевдотуберкулеза и сходных требований к условиям культивирования можно предположить, что добавление в питательную среду соединений, способствующих росту чумного микроба, при глубинном культивировании *Y. pseudotuberculosis* может обеспечить увеличение выхода биомассы. Среди прочих стимуляторов роста наибольший интерес при глубинном периодическом культивировании иерсиний представляют такие соединения, как соль Мора, аммоний молибденовоокислый, сульфит натрия. Согласно результатам исследований сотрудников Ставропольского противочумного института, данные соединения обеспечивают наибольший прирост биомассы *Y. pestis* EV при культивировании на средах с основой в виде гидролизатов белкового происхождения [2]. Кроме того, возможно применение в качестве ростостимулирующих добавок соединения органического происхождения на основе микробной или дрожжевой биомассы. Так, имеются сведения о возможности использования в качестве стимулятора роста в отношении возбудителя чумы и псевдотуберкулеза дрожжевых экстрактов [4, 7, 11].

Для оценки влияния стимулятора роста на процесс культивирования можно применять различные способы. Классическим считается комплекс методов однофакторного анализа «OFAT» (One Factor at a Time), заключающийся в изменении одного фактора или переменной, в то время как другие факторы зафиксированы в качестве фоновых. Данный метод находит применение для проведения «от-

© 2022 г. Салихов Р.Р., Волох О.А., Никифоров А.К.

\* Автор для переписки:

Салихов Руслан Римович

младший научный сотрудник, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

E-mail: salihow.ruslan2017@yandex.ru

сеивающих экспериментов» и нахождения «эффективного диапазона» параметра [14]. Использование статистических методов, то есть планов эксперимента «DoE» (Design of experiments) для оптимизации состава питательной среды, имеет большую эффективность, нежели методы «OFAT». Частным случаем является полный факторный эксперимент (ПФЭ), позволяющий спрогнозировать не только влияние фактора на отклик системы, но и достоверно оценить уровень взаимодействия факторов [3, 12, 13].

С учетом большой практической значимости процесса получения клеточной массы штаммов-адсорбентов и необходимости совершенствования технологии ее получения представляется актуальным изучение влияния стимуляторов роста на примере *Y. pseudotuberculosis* в условиях глубинного культивирования. В свою очередь, применение методов математического планирования даст возможность осуществить подбор стимуляторов роста *Y. pseudotuberculosis*, с получением достоверных и воспроизводимых результатов.

### Материалы и методы

В качестве модельного объекта исследований использовался штамм *Y. pseudotuberculosis* 68, полученный из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН РосНИПЧИ «Микроб».

Культуру выращивали на жидкой питательной среде с основой в виде ферментативного гидролизата фибрина, полученного согласно патенту № 2425866, с водородным показателем ( $7,2 \pm 0,2$ ) и содержанием аминного азота в размере 0,1%. На этапах реакторного культивирования (малообъемного и пилотного масштабов) осуществляли внесение углеродной подкормки из расчета 1,25‰ сухого вещества подкормки на литр культуральной жидкости в 1 час со второго по пятый часы культивирования.

Культивирование в условиях шейкера инкубатора проводили при соблюдении следующих параметров: частота вращения — 130 об/мин, в течение 24 часов при температуре 28 °С. Выращивание на лабораторном и пилотном ферментерах осуществляли с автоматическим контролем ключевых параметров: температура 28 °С, содержание растворенного кислорода в культуральной жидкости поддерживали на уровне  $40 \pm 5\%$ , рН культуральной среды корректировали путем внесения 10%-ного раствора  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

Варианты подготовки посевной культуры на разных этапах исследования отличались друг от друга, ввиду различных масштабов культивирования. При культивировании в условиях шейкера инкубатора смыв 48 ч

агаровой культуры инокулировали в колбы объемом 250 мл, содержащие 25 мл стерильной питательной среды. Массовая доля посевной дозы составляла  $2 \pm 0,1\%$  от объема культивирования. В вариантах культивирования в условиях лабораторного и пилотного биореакторов использовали 18 ч бульонную культуру в размере 10% от объема культивирования.

В качестве стимуляторов роста апробировались сульфит натрия ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), аммоний молибденовокислый четырехводный  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ , соль Мора  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , дрожжевой экстракт (автолизат) Difco.

Бактериальную концентрацию на этапах культивирования на шейкере-инкубаторе и пилотном ферментере определяли дискретно нефелометрически с использованием детектора мутности суспензий (длина волны —  $\lambda$  —  $565 \pm 15$  нм), при культивировании в условиях лабораторного ферментера в режиме реального времени с использованием оптической ячейки ( $\lambda$   $600 \pm 10$  нм). Микробиологическую чистоту культуры контролировали путем высева на плотную среду и микроскопией мазков, окрашенных по Граму. Иммунохимическую активность полученной клеточной массы контролировали методами РА на стекле (с применением иммуноглобулинов диагностических псевдотуберкулезных адсорбированных лошадиных, для реакции агглютинации на стекле производства ФКУН РосНИПЧИ «Микроб») и МФА (с использованием иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих псевдотуберкулезных адсорбированных лошадиных производства ФКУН РосНИПЧИ «Микроб»). Все этапы работы выполнялись в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

Определение эффективности и межфакторного взаимодействия стимуляторов роста проводили методом полного факторного эксперимента на двух уровнях, последующим нахождением уравнения регрессии, на основании которого методом крутого восхождения (Бокса — Уилсона) находили концентрации стимуляторов в питательной среде, приводящие к увеличению отклика функции, то есть параметра оптимизации [13]. Расчет биокинетических параметров роста микробной культуры в вариантах культивирования в биореакторах рассчитывали согласно общепринятым методам [8].

### Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования влияния стимуляторов роста на выход биомассы *Y. pseudotuberculosis* была проведена серия однофакторных отсеивающих экспериментов,

для определения наличия стимулирующего эффекта и диапазонов рабочих концентраций вносимых добавок. Было установлено, что на величину микробной концентрации *Y. pseudotuberculosis* оказывает влияние внесение в среду культивирования сульфата натрия, аммония молибденовокислого, дрожжевого экстракта. Стимулирующего влияния соли Мора не было отмечено, поэтому в дальнейшем исследовании указанное соединение не применялось.

В последующих экспериментах использовались стимуляторы, оказавшие положительный эффект. Степень влияния фактора на оптимизируемый параметр оценивали методом полнофакторного эксперимента, что позволяло реализовать все возможные комбинации исследуемых факторов. Значения верхнего (+1) и нижнего (-1) уровней варьирования факторов определяли согласно

результатам, полученным на предыдущем этапе. Исходя из этих значений, устанавливали основной уровень (0) и шаг варьирования ( $\sigma$ ). Ключевые параметры ростостимулирующих факторов представлены в таблице 1.

Количество опытов устанавливали по формуле:

$$N = n^k$$

где  $k$  — число факторов,  $n$  — количество уровней. Таким образом, в принятом нами плане ПФЭ  $2^3$  было исследовано 8 различных вариантов соотношений ростостимулирующих факторов на двух уровнях. Каждый опыт проводили в трех повторностях. Матрица планирования полного факторного эксперимента по определению ростостимулирующих факторов с результатами проведенных опытов представлена в таблице 2.

Таблица 1

**Значения факторов в натуральных переменных**

Компонент среды	Фактор	Основной уровень (0), г/л	Нижний уровень (-1), г/л	Верхний уровень (+1), г/л	Интервал варьирования ( $\sigma$ ), г/л
Сульфит натрия	$X_1$	0,2	0,1	0,3	0,1
Аммоний молибденовокислый	$X_2$	0,2	0,1	0,3	0,1
Дрожжевой автолизат	$X_3$	1,5	1,0	2,0	0,5

Таблица 2

**Расширенная матрица планирования полного факторного эксперимента по определению ростостимулирующих факторов для *Y. pseudotuberculosis***

№ опыта	Исследуемые факторы			Межфакторные взаимодействия				Результат опытов, $\times 10^9$ м.к./мл
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_1 X_2$	$X_1 X_3$	$X_2 X_3$	$X_1 X_2 X_3$	
0	0	0	0	0	0	0	0	13,8
1	-	-	-	+	+	+	-	14,7
2	+	-	-	-	-	+	+	13,9
3	-	+	-	-	+	-	+	15,9
4	+	+	-	+	-	-	-	15,9
5	-	-	+	+	-	-	+	17,1
6	+	-	+	-	+	-	-	18,1
7	-	+	+	-	-	+	-	18,6
8	+	+	+	+	+	+	+	18,1

Дисперсия воспроизводимости опытов  $S^2_{воспр}$  равнялась 0,25. Расчетный критерий Кохрена  $G_p = 0,21$ , был меньше табличного  $G_T = 0,51$ , что свидетельствует об однородности дисперсий и воспроизводимости опытов.

Коэффициенты уравнения регрессии определялись скалярным произведением соответствующего столбца  $Y$

на соответствующий столбец, отнесенный к числу опытов в матрице планирования  $N$ :

$$b_j = \frac{\sum_{i=1}^{N_0} x_{ji} y_i}{N}, j = \overline{1, k},$$

где  $b_j$  — коэффициент регрессии,  $N$  — число возможных комбинаций;  $x_{ji}$  — значение переменной в соответствующем столбце,  $y_i$  — отклик функции.

Кроме линейных коэффициентов, определяли коэффициенты двойного и тройного взаимодействия факторов. Согласно полученным результатам, строили уравнение регрессии, имевшее следующий вид:

$$Y = 16,52 - 0,08X_1 + 0,56X_2 + 1,40X_3 - 0,12X_1X_2 + 0,12X_1X_3 - 0,24X_2X_3 - 0,32X_1X_2X_3$$

Оценку значимости коэффициентов уравнения регрессии проводили согласно условию:

$$|b_i| \geq t_{0,05} S_b,$$

где  $|b_i|$  — сравниваемый коэффициент регрессии,  $t_{0,05}$  — табличное значение коэффициента Стьюдента при заданном уровне значимости 95% и степени свободы,  $S_b$  — оценка коэффициента уравнения регрессии, равная квадратному корню отношения дисперсии воспроизводимости и числа опытов.

Полученные данные свидетельствуют, что значимыми коэффициентами уравнения регрессии следует признать  $b_2$  и  $b_3$  и их следует включить в модель. Коэффициенты  $b_1, b_{12}, b_{13}, b_{23}, b_{123}$  незначимы, и их следует исключить из модели. Таким образом, статистически значимое влияние на прирост биомассы *Y. pseudotuberculosis* обеспечивает добавление в питательную среду аммония молибденовокислого и дрожжевого экстракта. Ввиду отсутствия статистически значимого влияния сульфата натрия на оптимизируемый параметр — данный компонент исключается из модели и в дальнейшем исследовании не применялся. Таким образом, математическая модель имела следующий вид:

$$Y = 16,52 + 0,56X_2 + 1,40X_3$$

Так как план является ненасыщенным (число значимых коэффициентов уравнения < числа опытов в эксперименте) произвели проверку адекватности полученной модели с использованием F-критерия Фишера. Расчетное значение критерия Фишера  $F_p = 2,08$  оказалось меньше табличного значения критерия Фишера  $F_T = 5,79$ , что доказывает адекватность описанной нами модели.

Исходя из полученного уравнения регрессии, можно сделать вывод: одновременное увеличение концентраций факторов  $X_2$  (аммоний молибденовокислый) и фактора  $X_3$  (дрожжевой экстракт) способствует увеличению выхода биомассы. После получения модели объекта проводили оптимизацию процесса, то есть находили такие значения факторов, которые приводили бы к экстремуму целевой функции. С этой целью применялся метод крутого восхождения.

Величину шага движения по градиенту определили в размере 0,5 г/л для дрожжевого экстракта, так как размер шага движения по градиенту ( $h_i$ ) не может превышать интервал варьирования фактора; аналогичная величина для аммония молибденовокислого, согласно проведенным расчетам, составила 0,05 г/л. В качестве исходной точки для движения по градиенту определялся опыт с наибольшим откликом функции при проведении факторного эксперимента.

Для проверки соответствия аппроксимации процесса описанной ранее математической модели, наряду с реализованными опытами ( $Y_{\text{реал}}$ ), осуществляли «теоретические эксперименты ( $Y_{\text{теор}}$ )», спланированные согласно вышеприведенному уравнению регрессии: результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3

### Результаты поиска экстремума функции, выполненного методом крутого восхождения

№ опыта	$X_2$ , г/л	$X_3$ , г/л	$Y_{\text{теор}}$ , $\times 10^9$ м.к./мл	$\bar{Y}_{\text{реал}}$ , $\times 10^9$ м.к./мл
1	0,30	2,0	19,5	18,7
2	0,35	2,5	20,2	—
3	0,40	3,0	20,9	19,9
4	0,45	3,5	21,7	—
5	0,50	4,0	22,4	22,3
6	0,55	4,5	23,1	21,9
7	0,60	5,0	23,9	21,7

Исходя из полученных результатов, можно утверждать, что осуществленный нами эксперимент оказался успешным. Использование метода «крутого восхождения» дало возможность увеличить выход биомассы на  $19,9 \pm 2,0\%$  в сравнении с результатами, достигнутыми на предыдущем этапе. Концентрации аммония молибденовокислого и дрожжевого экстракта в питательной среде, обеспечивающие эффективное увеличение микробной массы *Y. pseudotuberculosis*, составили  $4,0 \pm 0,1$  г/л и  $0,5 \pm 0,01$  г/л, соответственно. Дальнейшее увеличение указанных ростостимулирующих факторов не способствовало увеличению концентрации микробных клеток, что, вероятнее всего, объясняется лимитированием роста культуры неизвестным фактором, согласно закону Либиха.

Положительный эффект соединений аммония молибденовокислого на прирост биомассы бактерий *Y. pseudotuberculosis* обеспечивается способностью к раскрытию белковых связей молекул, делая их более доступными для культивируемого микроорганизма [1].

Влияние дрожжевого экстракта, по всей видимости, объясняется уникальным аминокислотным составом и повышенным содержанием витаминов, обеспечивающих активный рост клеток *Y. pseudotuberculosis* [5].

Применяя полученные результаты, проводили культивирование в условиях лабораторного ферментера с целью последующего масштабирования процесса. Кривые роста *Y. pseudotuberculosis* 68 на стандартном и оптимизированном (с добавлением стимуляторов роста) представлены на графике (рис. 1).

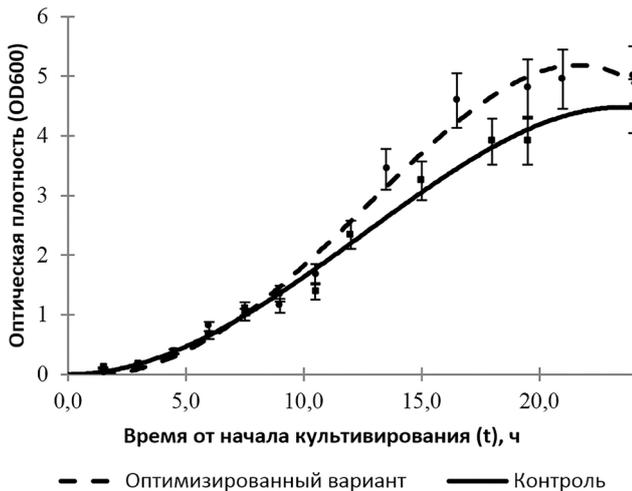


Рис. 1. Аппроксимированные кривые роста *Y. pseudotuberculosis* 68 при культивировании в условиях лабораторного ферментера на стандартной питательной среде (контроль) и с добавлением ростостимулирующих добавок (оптимизированный вариант)

Характер изменения кривой роста в обоих вариантах был схож, однако темпы прироста микробной популяции в оптимизированном варианте питательной среды были выше на  $5,3 \pm 1,3\%$ , что в конечном итоге обеспечило больший конечный прирост биомассы  $19,1 \pm 3,5\%$ , чем в контрольном варианте.

Следует отметить, что внесение аммония молибденовокислого способствует незначительному снижению водородного показателя среды, однако в ходе культивирования возбудителя псевдотуберкулеза наблюдалось защелачивание культуральной жидкости в период логарифмической фазы роста, что нивелирует возможность значительных сдвигов pH культуральной жидкости.

Результаты вышеприведенных экспериментов были перенесены на более масштабный вариант культивирования в пилотном ферментере. По аналогии с предыдущим этапом была проведена серия экспериментальных (опыт) и контрольных культивирований. Результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4

### Культивирование в условиях пилотного ферментера *Y. pseudotuberculosis* 68 на стандартной питательной среде (контроль) и с добавлением ростостимулирующих добавок (оптимизированный вариант)

Варианты культивирования	Бактериальная концентрация, $\times 10^9$ м.к./мл	Выход клеточной массы, г/л
Опыт	$25 \pm 1,5$	$15,0 \pm 0,4$
Контроль	$20 \pm 0,8$	$18,7 \pm 1,1$

Как и в ранее проведенных исследованиях, внесение стимуляторов роста в питательную среду показало свою эффективность: бактериальная концентрация в период стационарной фазы роста была увеличена более чем на 20%, чему соответствовало соразмерное увеличение выхода клеточной массы.

Морфология клеток *Y. pseudotuberculosis* в мазках по Граму, полученных в вариантах культивирования с внесением стимуляторов, не была отлична от клеток, полученных в контрольном варианте. Исходя из результатов, полученных с применением реакции агглютинации на стекле и люминесцентной микроскопии, иммунохимические свойства клеток также не были различны в экспериментальных (с внесением стимуляторов роста) и в контрольном вариантах.

### Заключение

Применение математических методов планирования экспериментов при решении задач оптимизации глубинного культивирования псевдотуберкулезного микроба позволяет эффективно осуществлять контроль процесса. В проведенном исследовании показана возможность применения в качестве стимуляторов роста при культивировании *Y. pseudotuberculosis* аммония молибденовокислого и дрожжевого экстракта с конечным содержанием в питательной среде  $4,0 \pm 0,1$  г/л и  $0,5 \pm 0,01$  г/л соответственно, что, в свою очередь, позволяет увеличить выход биомассы в среднем на 20%.

### Литература

1. Абзаева Н.В., Гостищева С.Е., Катунина Л.С., Ростовцева Д.В., Иванова Г.Ф., Костроминов А.В., Курилова А.А. Использование ростостимулирующих добавок в питательных средах для масштабирования процесса производства препарата вакцины чумной живой // Вестник биотехнологии и физико-химической

- биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2020. — Т. 16. — № 3. — С. 5–9.
2. Абзаева Н.В., Гостищева С.Е., Старцева О.Л., Катунина Л.С., Ковалев Д.А., Иванова Г.Ф., Костроминов А.В., Курилова А.А. Изучение влияния экспериментальных основ на ростовые качества жидких питательных сред для глубинного культивирования вакцинного штамма чумного микроба // Проблемы особо опасных инфекций. — 2022. — № 1. — С. 71–76.
  3. Бирюков В.В., Кантере В.М. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. — М.: Наука, 1985. — 296 с.
  4. Домотенко Л.В., Подкопаева Я.В., Храмов М.В., Дятлов И.А. Питательные среды для диагностики чумы // Проблемы особо опасных инфекций. — 2009. — № 4(102). — С. 480–484.
  5. Дятлов И.А., Кутырев В.В., Храмов М.В. Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации возбудителей особо опасных инфекций бактериальной природы. — М.: 2012. — 415 с.
  6. Кривошеева А.М., Бузолева Л.С., Айздайчер Н.А. Стимулятор роста *Yersinia pseudotuberculosis* Патент на изобретение RU 2502796 C2, 27.12.2013. Заявка № 2012107641/10 от 01.03.2012.
  7. Никифоров А.К., Антонычева М.В., Жулидов И.М. и др. Новые питательные среды для культивирования чумы и холеры. Материалы X съезда ВНПОЭМП, Москва, 12–13 апреля 2012 г. // Инфекция и иммунитет. — 2012. — Т. 2. — № 1–2. — С. 306.
  8. Перт С.Д. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. — М.: Мир, 1978. — 331 с.
  9. Псарева Е.К., Андрияков Б.Г., Тимченко Н.Ф. Нейромедиаторы как стимулятор роста *Yersinia pseudotuberculosis* // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. — 2015. — № 27(27). — С. 40–43.
  10. Салихов Р.Р., Борисова С.В., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И., Волох О.А. Оптимизация условий культивирования *Yersinia pseudotuberculosis* в процессе получения клеточной массы // Проблемы особо опасных инфекций. — 2021. — № 4. — С. 137–142.
  11. Смирнов И.В., Царьков В.В. Питательная среда для выделения возбудителей кишечного иерсиниоза и псевдотуберкулеза. Патент на изобретение RU 2251570 C2, опубл. 22.03.2018.
  12. Fisher R.A. The arrangement of field experiments / In Breakthroughs in Statistics. Eds S. Kotz and N.L. Johnson. — New York, NY: Springer-Verlag Inc., 1992. — P. 82–91.
  13. Montgomery Douglas C. Design and Analysis of Experiments. — Wiley, 2019. — 688 p.
  14. Singh V., Haque S., Niwas R., Srivastava A., Pasupuleti M., Tripathi C.K.M. Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review // Front. Microbiol. — 2017. — 7. — Art. 2087. doi: 10.3389/fmicb.2016.02087.

## References

1. Abzayeva NV, Gostishcheva SYe, Katunina LS, Rostovtseva DV, Ivanova GF, Kostrominov AV, Kurilova AA. Ispol'zovaniye rostostimuliruyushchikh dobavok v pitatel'nykh sredakh dlya masshtabirovaniya protsessa proizvodstva preparata vaksiny chumnoy zhivoy. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova 2020; 16(3):5–9 (in Russian).
2. Abzayeva NV, Gostishcheva SYe, Startseva OL, Katunina LS, Kovalev DA, Ivanova GF, Kostrominov AV, Kurilova AA. Izucheniye vliyaniya eksperimental'nykh osnov na rostovyye kachestva zhidkikh pitatel'nykh sred dlya glubinnogo kul'tivirovaniya vaksinnogo shtamma chumnogo mikroba. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2022; 1:71–76 (in Russian).
3. Biryukov VV, Kantere VM. Optimizatsiya periodicheskikh protsessov mikrobiologicheskogo sinteza. Moscow: Nauka, 1985: 296 (in Russian).
4. Domotenko LV, Podkopayeva YAV, Khramov MV, Dyatlov IA. Pitatel'nyye sredy dlya diagnostiki chumy. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2009; 4(102):480–484 (in Russian).
5. Dyatlov IA, Kutyrev VV, Khramov MV. Pitatel'nyye sredy dlya vydeleniya, kul'tivirovaniya i identifikatsii vzbuditeley osobo opasnykh infektsiy bakterial'noy prirody. Moscow: 2012: 415 (in Russian).
6. Krivosheyeva AM, Buzoleva LS, Ayzdaycher NA. Stimulyator rosta *Yersinia pseudotuberculosis* Patent na izobreteniyе RU 2502796 C2, 27.12.2013. Zayavka № 2012107641/10 от 01.03.2012 (in Russian).
7. Nikiforov AK, Antonycheva MV, Zhulidov IM i dr. Novyye pitatel'nyye sredy dlya kul'tivirovaniya chumy i kholery. Materialy X s'yezda VNPOEMP, Moskva, 12–13 aprelya 2012 g. Infektsiya i immunitet 2012; 2(1–2):306 (in Russian).
8. Pert SD. Osnovy kul'tivirovaniya mikroorganizmov i kletok. Moscow: Mir, 1978: 331 (in Russian).
9. Psareva YeK, Andryukov BG, Timchenko NF. Neyromediator kak stimulyator rosta *Yersinia pseudotuberculosis*. Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii 2015; 27(27):40–43 (in Russian).
10. Salikhov RR, Borisova SV, Avdeyeva NG, Samokhvalova YuI, Volokh OA. Optimizatsiya usloviy kul'tivirovaniya *Yersinia pseudotuberculosis* v protsesse polucheniya kletochnoy massy. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2021; 4:137–142 (in Russian).
11. Smimov IV, Tsar'kov VV. Pitatel'naya sreda dlya vydeleniya vzbuditeley kishhechnogo iyersinioza i psevdotuberkuleza. Patent na izobreteniyе RU 2251570 C2, opubl. 22.03.2018 (in Russian).
12. Fisher RA. The arrangement of field experiments. In Breakthroughs in Statistics. Eds S Kotz and NL Johnson. New York, NY: Springer-Verlag Inc., 1992: 82–91.
13. Montgomery Douglas C. Design and Analysis of Experiments. Wiley, 2019: 688.
14. Singh V, Haque S, Niwas R, Srivastava A, Pasupuleti M, Tripathi CKM. Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review. Fron. Microbiol 2017; 7:2087. doi: 10.3389/fmicb.2016.02087.

## APPLICATION OF MATHEMATICAL PLANNING METHODS IN STUDYING THE INFLUENCE OF GROWTH PROMOTING SUPPLEMENTS ON THE GROWTH OF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

R.R. SALIKHOV, O.A. VOLOKH, A.K. NIKIFOROV

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

A growth medium for submerged cultivation of Far East scarlet-like fever pathogen was optimized via mathematical planning. *Y. pseudotuberculosis* 68 was used as a model strain. Optimization process based on full factorial experiment (FFD 2<sup>3</sup> full factorial design with 3 factors and 2 levels) with progression through concentration gradient to locate the extremum. Targeted parameter for optimization is a concentration of bacteria. Process was scaled gradually. Yeast extract and ammonium orthomolybdate were used as a growth stimulant to provide an increase of *Y. pseudotuberculosis* biomass growth. Concentrations of stimulants that increases yield of cell mass was proven experimentally.

*Keywords:* *Yersinia pseudotuberculosis*, adsorbent-strains, periodic submerged cultivation, full factorial design, growth stimulants, mathematical planning.

### **Address:**

Salikhov R.R.  
junior researcher, Russian Research Anti-Plague  
Institute «Microbe», Saratov  
E-mail: salihov.ruslan2017@yandex.ru

### **Для цитирования:**

Салихов Р.Р., Волох О.А., Никифоров А.К. Применение методов математического планирования при изучении влияния ростостимулирующих добавок на рост *Yersinia pseudotuberculosis*. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(4):20–26.

### **For citation:**

Salikhov R.R., Volokh O.A., Nikiforov A.K. Application of mathematical planning methods in studying the influence of growth promoting supplements on the growth of *Yersinia pseudotuberculosis*. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(4):20–26 (in Russian).

## НАКОПЛЕНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ЗАРЯДА В БАТАРЕЕ НА ОСНОВЕ БЕЛКОВ И ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИХ ГИДРОГЕЛЕЙ

Е.А. БОБРОВА<sup>1,2\*</sup>, П.М. ГОТОВЦЕВ<sup>1,2</sup>, М.С. АКСЁНОВА<sup>1,2</sup>, Ю.М. ПАРУНОВА<sup>1</sup>, Р.Г. ВАСИЛОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»*,

<sup>2</sup> *Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)*

В настоящее время значительное внимание уделяется поиску альтернативы широко применяемым моделям аккумуляторов. Необходим коммерчески оправданный подход к созданию аккумуляторов с использованием возобновляемых или хотя бы легко утилизируемых компонентов. В данной работе представлена биобатарея на основе электродов из PEDOT:PSS и электролита, содержащего бычий сывороточный альбумин. Были измерены электрические емкости полученной ячейки в зависимости от содержания белка. В ходе измерений установлено, что при увеличении концентрации БСА до 0,0015% значения емкостей линейно возрастают, достигая 70 мкФ.

**Ключевые слова:** биобатарея, биоэлектрохимические устройства, электропроводящие гидрогели, углеродные нанотрубки, PEDOT:PSS.

### Введение

Литий-ионные аккумуляторы, которые на данный момент активно используются в бытовой электронике и электротранспорте, имеют высокую плотность энергии, быстро подзаряжаются, не требуют обслуживания. Однако имеется ряд недостатков, связанных с безопасностью их использования и экологичностью производства и утилизации [10]. Данные аккумуляторы содержат легковоспламеняющиеся электролиты, токсичные материалы, а для увеличения производства требуется доступ к литию и оксидам металлов для электродов. Поэтому сегодня все больше внимания уделяется исследованию систем хранения заряда, которые являлись бы заменой существующим. Такие системы должны быть экономными с точки зрения использования ресурсов, масштабирования и промышленной осуществимости, а также экологически безопасными на протяжении всего жизненного цикла, включая добычу, использование и переработку. Батареи на органической основе являются многообещающей альтернативой и дают возможность использовать недорогие, легкодоступные материалы [5, 9, 11].

В настоящее время уже ведется поиск наиболее эффективных биоматериалов для применения в качестве

основных компонентов батарей, например, электродов [7]. Обычно рассматриваются такие материалы, как полисахариды, лигнин, аминокислоты, коллаген [8, 14, 17]. Элементы и функциональные группы данных веществ могут быть склонны к ионному обмену в водных растворах, что делает их перспективными компонентами биологического происхождения для аккумуляторов.

Значительную популярность набирают электропроводящие гидрогели, которые представляют собой трехмерную матрицу из сшитых полимерных цепей, способных набухать в водных растворах. Полимерный гидрогель на основе производного политиофена — поли-(3,4-этилендиокситиофена) (PEDOT) — уже зарекомендовал себя как материал с высокой электропроводимостью [2, 16], электрохимической стабильностью [18] и биосовместимостью [19]. В качестве добавки для повышения электропроводимости гидрогелей используются нанотрубки [3, 15].

Белковые структуры демонстрируют хорошую электропроводимость в качестве матриц катодных материалов, исследуются в процессах переноса электронов в водных растворах. В данный момент показано, что основными способами транспорта электронов в пептидах являются туннелирование на большие расстояния и прыжковый транспорт [6, 12]. Поэтому такие структуры могут способствовать дальнейшему переносу зарядов в растворе.

БСА, белок плазмы, связывает и переносит ряд гидрофильных молекул, легко адсорбирующихся на поверхностях, что делает его подходящим претендентом для компонента батареи [13].

© 2022 г. Боброва Е.А., Готовцев П.М., Аксёнова М.С., Парунова Ю.М., Василов Р.Г.

\* **Автор для переписки:**

Боброва Екатерина Александровна

Лаборант-исследователь, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

E-mail: bobrova.ea@phystech.edu

Цель настоящей работы состоит в анализе емкостей ячейки биобатареи в зависимости от концентрации содержащегося в электролите белка. Также была показана возможность сборки простейшей системы накопления заряда, состоящей полностью из биосовместимых материалов.

## Материалы и методы

Ячейка биобатареи представляет собой систему из двух одинаковых гелевых обкладок-электродов размером 2,1 см × 0,8 см и электролита. Макроскопические размеры электродов во втором эксперименте увеличены на 10%. Объем ячейки 3,5 мл, объем электролита в ячейке 2 мл.

За основу электродов были взяты гидрогели PEDOT:PSS с нанотрубками, приготовленные по методу, изложенному в работе [13]. Отдельно при температуре 70 °С были приготовлены растворы поливинилового спирта (PVA) и каррагинана (CRG) с концентрацией 1,3 wt%. Далее полученные два компонента смешивались с 1,3 wt% PEDOT:PSS. Таким образом, было достигнуто соотношение компонентов в смеси 1:1:1. На этом же этапе были добавлены 2 масс. % нанотрубок, модифицированных полианилином, массовая доля УНТ 65%, массовая доля полианилина 35% («Таунит-М», Россия). Затем смесь поместили в чашку Петри, после чего она прошла 4 цикла заморозки и разморозки. На финальном этапе приготовления гель был высушен при температуре 40 °С до сухого остатка.

Для электролита использовался физиологический раствор (ФР) (0,9% концентрация NaCl). В качестве белка выступал бычий сывороточный альбумин (БСА). Сначала анализ проводился в его отсутствие, а далее при добавлении и увеличении концентрации. Концентрацию БСА увеличивали от 0,0005% в 2 и 3 раза.

Емкость биобатареи определялась с использованием метода циклической вольтамперометрии. Измерение вольтамперной характеристики (ВАХ) осуществлялось с помощью потенциостата/гальваностата AUTOLAB PGSTAT302N по двухэлектродной схеме. Скорость сканирования была равна: 10 мВ/с, каждая ВАХ снималась три раза.

## Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлена вольтамперная характеристика для ячейки с электролитом, не содержащим белка. Емкость ячейки определяется площадью внутри циклической характеристики и составила 13 мкФ. Наличие такой емкости обусловлено тем, что используемые в качестве

электродов гидрогели сами по себе могут накапливать заряд, что было показано ранее [4]. Добавление БСА привело к существенному увеличению емкости, что видно на рисунке 2, результаты расчета полученных емкостей представлены в таблице 1. Увеличение концентрации БСА в ячейке приводило и к увеличению электрической емкости.

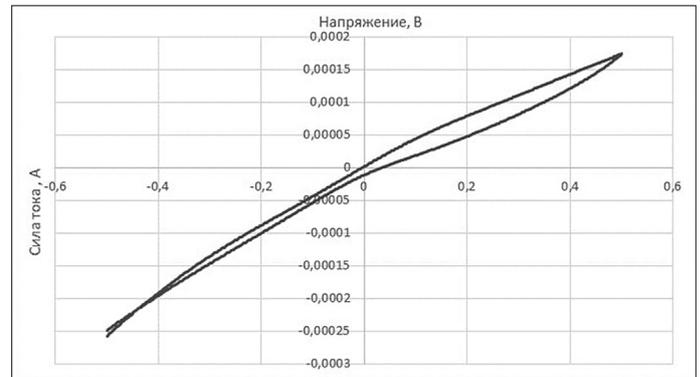


Рис. 1. Вольтамперограмма ячейки с физраствором

Целью второго эксперимента было проверить, как повлияет увеличение площади обоих электродов на электрическую емкость ячейки. Полученные ВАХ представлены на рисунке 2, а результаты расчета электрических емкостей в таблице 1.

Таблица 1

### Зависимость электрической емкости от концентрации белка в электролите

Концентрация БСА, wt%	Емкость ячейки, мкФ	
	Первый эксперимент	Второй эксперимент
0,0005	23	56
0,001	25	61
0,0015	30	74

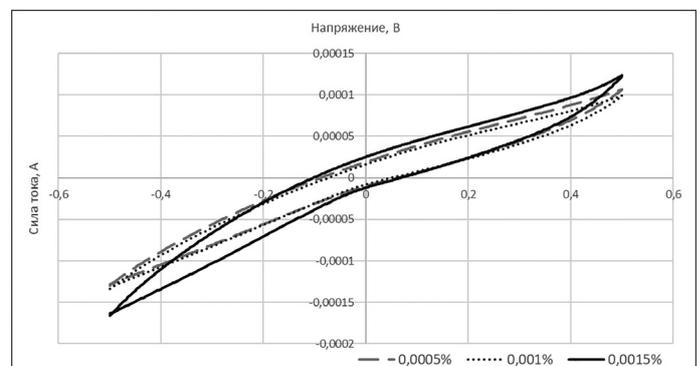


Рис. 2. Вольтамперограмма ячейки с физраствором с различными концентрациями белка, 1-я серия

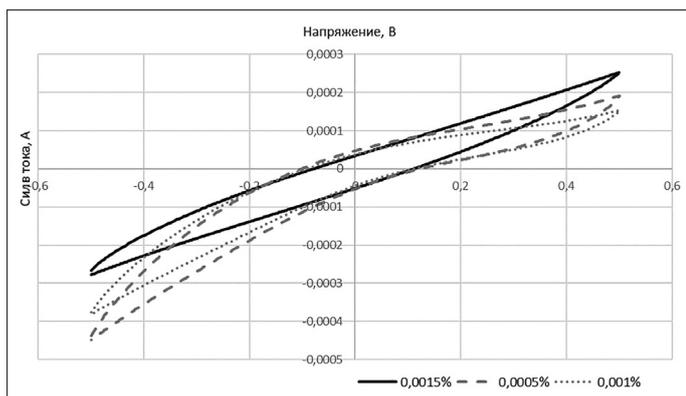


Рис. 3. Вольтамперограмма ячейки с физраствором с различными концентрациями белка, 2-я серия

Увеличение площадей электродов всего на 10% привело к росту электрической емкости более чем в два раза. Возможным объяснением такого эффекта может быть, то, что изначально электроды обладали недостаточной поверхностью, чтобы обеспечить межмолекулярные взаимодействия со значительной частью молекул белка в растворе. Как и рост концентрации, увеличение поверхности позволяет повысить частоту таких взаимодействий. Кроме того, использованные в работе гидрогели сами по себе обладают электрической емкостью [4]. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение данных явлений и анализ механизмов транспорта и накопления заряда в ячейке.

Следует отметить, что полученные значения электрической емкости не являются предельными и возможно их повышение. В частности, в дальнейшем планируется исследовать как увеличение электродов, так и концентрации белка в электролите. Кроме того, используемые в работе гидрогели можно модифицировать не только углеродными нанотрубками, но также ферментами [1], что также может повлиять на свойства батарей.

### Заключение

В данной работе была продемонстрирована ячейка биобатареи, которая может стать основой для большого количества приложений в биосовместимых устройствах в качестве системы для накопления заряда. Также удалось показать, что присутствие в электролите белка может улучшить емкостные показатели батареи, а увеличение концентрации приводит к росту этого значения. Максимальное значение емкости, которого удалось достичь в ходе экспериментов, составило 74 мкФ. Полученные результаты говорят о перспективности использования гидрогелей и белков для создания батарей.

Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт», тематический план 1.11. «Разработка технологических решений по созданию бионических имплантируемых сенсорных устройств и метаболических преобразователей энергии».

### Литература

1. Antipova S.G., Parunova Y.M., Vishnevskaya M.V., Krashennnikov S.V., Lukanina K.I., Grigoriev T.E., Chvalun S.N., Gotovtsev P.M. Biomechanical behaviour of PEDOT:PSS-based hydrogels as an electrode for stent integrated enzyme biofuel cells // *Heliyon*. — 2022. — Vol. 8. — e09218. doi:10.1016/J.HELIYON.2022.E09218.
2. Bianchi M., Carli S., Di Lauro M., Prato M., Murgia M., Fadiga L., Biscarini F. Scaling of capacitance of PEDOT:PSS: volume vs. area // *J. Mater. Chem. C*. — 2020. — Vol. 8(32). — P. 11252–11262.
3. Chłopek J., Czajkowska B., Szaraniec B., Frackowiak E., Szostak K., Béguin F. In vitro studies of carbon nanotubes biocompatibility // *Carbon*. — 2006. — Vol. 44(6). — P. 1106–1111.
4. Gotovtsev P.M., Badranova G.U., Zubavichus Y.V., Chumakov N.K., Antipova Ch.G., Kamyshinsky R.A. et al. Electroconductive PEDOT:PSS-based hydrogel prepared by freezing-thawing method // *Heliyon*. — 2019. — Vol. 5(9). — e02498. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02498.
5. Hussain Z., Zuhra, Rukh G., Zada A., Naz M.Y., Khan K.M. et al. Construction of rechargeable bio-battery cells from electroactive antioxidants extracted from wasted vegetables // *Cleaner Engineering and Technology*. — 2021. — Vol. 5. — Art. 100342. doi: 10.1016/j.clet.2021.100342.
6. Ing N.L., El-Naggar M.Y., Hochbaum A.I. Going the distance: Long-range conductivity in protein and peptide bioelectronic materials // *The Journal of Physical Chemistry. B*. — 2018. — Vol. 122(46). — P. 10403–10423.
7. Jo C.H., Voronina N., Sun Y.K., & Myung S.T. Gifts from nature: Bio-inspired materials for rechargeable secondary batteries // *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*. — 2021. — Vol. 33(37). — e2006019. doi:10.1002/adma.202006019.
8. Jung H.Y., Lee J.S., Han H.T., Jung J., Eom K., Lee J.T. Lignin-based materials for sustainable rechargeable batteries // *Polymers*. — 2022. — Vol. 14(4). — Art. 673. doi: 10.3390/polym14040673.
9. Liedel C. Sustainable battery materials from biomass // *ChemSusChem*. — 2020. — Vol. 13(9). — P. 2110–2141.
10. Lisbona D., Snee T. A review of hazards associated with primary lithium and lithium-ion batteries // *Process Safety and Environmental Protection*. — 2011. — Vol. 89(6). — P. 434–442.
11. Liu L., Solin N., Inganäs O. Bio based batteries // *Adv. Energy Mater.* — 2021. — Vol. 11(43). — Art. 2003713. doi: 10.1002/aenm.202003713.

12. Malak R.A., Gao Z., Wishart J.F., Isied S.S. Long-range electron transfer across peptide bridges: the transition from electron superexchange to hopping // *Journal of the American Chemical Society*. — 2004. — Vol. 126(43). — P. 13888–13889.
13. Nawade A., Busi K.B., Ramya K., Dalapati G.K., Mukhopadhyay S., Chakraborty S. Improved charge transport across bovine serum albumin-Au nanoclusters' hybrid molecular junction // *ACS omega*. — 2022. — Vol. 7(24). — P. 20906–20913.
14. Rohan R., Kuo T.-Ch., Chiou Ch.-Y., Chang Y.-L., Li Ch.-Ch., Jyh-Tsung L. Low-cost and sustainable corn starch as a high-performance aqueous binder in silicon anodes via in situ cross-linking // *Journal of Power Sources*. — 2018. — Vol. 396. — P. 459–466.
15. Ruoff R.S., Lorents D.C. Mechanical and thermal properties of carbon nanotubes // *Carbon*. — 1995. — Vol. 33(7). — P. 925–930.
16. Shi H., Liu C.C., Q. Jiang, Xu J. Effective approaches to improve the electrical conductivity of PEDOT:PSS: A review // *Adv. Electron. Mater.* — 2015. — Vol. 1(4). — Art. 1500017. doi: 10.1002/aelm.201500017.
17. Sundaramurthy I., Thiyagarajan G., Panda R.C., Sankar S. Collagen and carbon-ferrous nanoparticles used as a green energy composite material for energy storage devices // *CMS*. — 2021. — Vol. 14(1). — P. 80–92.
18. Yang C.H., Suo Zh. Hydrogel ionotronics // *Nat. Rev. Mater.* — 2018. — Vol. 3(6). — P. 125–142.
19. Yang M., Zhang Y., Zhang H., Li Zh. Characterization of PEDOT:PSS as a biocompatible conductive material / *Materials 10<sup>th</sup> IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems*. — 2015. — P. 149–151. doi: 10.1109/NEMS.2015.7147397.
5. Hussain Z, Zuhra, Rukh G, Zada A, Naz MY, Khan KM et al. Construction of rechargeable bio-battery cells from electroactive antioxidants extracted from wasted vegetables. *Cleaner Engineering and Technology* 2021; 5:100342. doi: 10.1016/j.clet.2021.100342.
6. Ing NL, El-Naggar MY, Hochbaum AI. Going the distance: Long-range conductivity in protein and peptide bioelectronic materials. *The Journal of Physical Chemistry. B* 2018; 122(46):10403–10423.
7. Jo CH, Voronina N, Sun YK, & Myung ST. Gifts from nature: Bio-inspired materials for rechargeable secondary batteries. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* 2021; 33(37):e2006019. doi: 10.1002/adma.202006019.
8. Jung HY, Lee JS, Han HT, Jung J, Eom K, Lee JT. Lignin-based materials for sustainable rechargeable batteries. *Polymers* 2022; 14(4):673. doi: 10.3390/polym14040673.
9. Liedel C. Sustainable battery materials from biomass. *ChemSusChem* 2020; 13(9):2110–2141.
10. Lisbona D, Snee T. A review of hazards associated with primary lithium and lithium-ion batteries. *Process Safety and Environmental Protection* 2011; 89(6):434–442.
11. Liu L, Solin N, Inganäs O. Bio based batteries. *Adv. Energy Mater* 2021; 11(43):2003713. doi: 10.1002/aenm.202003713.
12. Malak RA, Gao Z, Wishart JF, Isied SS. Long-range electron transfer across peptide bridges: the transition from electron superexchange to hopping. *Journal of the American Chemical Society* 2004; 126(43):13888–13889.
13. Nawade A, Busi KB, Ramya K, Dalapati GK, Mukhopadhyay S, Chakraborty S. Improved charge transport across bovine serum albumin-Au nanoclusters' hybrid molecular junction. *ACS omega* 2022; 7(24):20906–20913.
14. Rohan R, Kuo T-Ch, Chiou Ch-Y, Chang Y-L, Li Ch-Ch, Jyh-Tsung L. Low-cost and sustainable corn starch as a high-performance aqueous binder in silicon anodes via in situ cross-linking. *Journal of Power Sources* 2018; 396:459–466.
15. Ruoff RS, Lorents DC. Mechanical and thermal properties of carbon nanotubes. *Carbon* 1995; 33(7):925–930.
16. Shi H, Liu CC, Q Jiang, Xu J. Effective approaches to improve the electrical conductivity of PEDOT:PSS: A review. *Adv Electron Mater* 2015; 1(4):1500017. doi: 10.1002/aelm.201500017.
17. Sundaramurthy I, Thiyagarajan G, Panda RC, Sankar S. Collagen and carbon-ferrous nanoparticles used as a green energy composite material for energy storage devices. *CMS* 2021; 14(1):80–92.
18. Yang CH, Suo Zh. Hydrogel ionotronics. *Nat Rev Mater* 2018; 3(6):125–142.
19. Yang M., Zhang Y., Zhang H., Li Zh. Characterization of PEDOT:PSS as a biocompatible conductive material. *Materials 10<sup>th</sup> IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems* 2015:149–151. doi: 10.1109/NEMS.2015.7147397.

## References

1. Antipova CG, Parunova YM, Vishnevskaya MV, Krashenninnikov SV, Lukanina KI, Grigoriev TE, Chvalun SN, Gotovtsev PM. Biomechanical behaviour of PEDOT:PSS-based hydrogels as an electrode for stent integrated enzyme biofuel cells. *Heliyon* 2022; 8:e09218. doi:10.1016/J.HELIYON.2022.E09218.
2. Bianchi M, Carli S, Di Lauro M, Prato M, Murgia M, Fadiga L, Biscarini F. Scaling of capacitance of PEDOT:PSS: volume vs. area. *J Mater Chem C* 2020; 8(32):11252–11262.
3. Chłopek J, Czajkowska B, Szaraniec B, Frackowiak E, Szostak K, Béguin F. In vitro studies of carbon nanotubes biocompatibility. *Carbon* 2006; 44(6):1106–1111.
4. Gotovtsev PM, Badranova GU, Zubavichus YV, Chumakov NK, Antipova ChG, Kamyshinsky RA et al. Electroconductive PEDOT:PSS-based hydrogel prepared by freezing-thawing method. *Heliyon* 2019; 5(9):e02498. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02498.

## ELECTRIC CHARGE ACCUMULATION IN A BATTERY BASED ON PROTEINS AND ELECTRICALLY CONDUCTIVE HYDROGELS

E.A. BOBROVA<sup>1,2</sup>, P.M. GOTOVTSEV<sup>1,2</sup>, M.S. AKSENOVA<sup>1,2</sup>, Y.M. PARUNOVA<sup>1</sup>, R.G. VASILOV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*National Research Centre «Kurchatov Institute», Department of Biotechnology and Bioenergy,*

<sup>2</sup>*Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University)*

Today significant attention is given to find alternatives to widely used battery models. A commercially viable approach is needed to create batteries using renewable or at least easily recyclable components. This study presents a biobattery based on PEDOT:PSS electrodes and an electrolyte with bovine serum albumin. The electrical capacitances of the obtained cell as a function of protein concentration were measured. During the measurements it was found that with increasing BSA concentration up to 0.0015 wt%, the capacitance values increase linearly, reaching 74  $\mu\text{F}$ .

*Keywords:* biobattery, bioelectrochemical devices, electrically conductive hydrogels, carbon nanotubes, PEDOT:PSS.

### **Address:**

Bobrova E.A.

research laboratory assistant,

National Research Centre «Kurchatov Institute»

E-mail: bobrova.ea@phystech.edu

### **Для цитирования:**

Боброва Е.А., Готовцев П.М., Аксёнова М.С., Парунова Ю.М., Василов Р.Г. Накопление электрического заряда в батарее на основе белков и электропроводящих гидрогелей. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(4):27–31.

### **For citation:**

Bobrova E.A., Gotovtsev P.M., Aksenova M.S., Parunova Y.M., Vasilov R.G. Electric charge accumulation in a battery based on proteins and electrically conductive hydrogels. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(4):27–31 (in Russian).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК *VIBRIO CHOLERAЕ* O1 И O139 СЕРОГРУППЫ НА ПЛАСТИКОВОМ СУБСТРАТЕ МАТЕРИАЛА МЕДИЦИНСКОЙ МАСКИ

С.В. ТИТОВА\*, Е.А. МЕНЬШИКОВА, С.О. ВОДОПЬЯНОВ,  
И.П. ОЛЕЙНИКОВ, О.В. БОРОДИНА, Н.А. СЕЛЯНСКАЯ

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

Экспериментальные данные по колонизации поверхности стекла и пищевого пластика холерными вибрионами подчеркивают роль пластисферы в глобальном распространении морскими течениями вибрионов, колонизировавших эти поверхности. Согласно данным гонконгской организации Ocean Asia за 2020 год, в моря и океаны попало около 1,56 млрд одноразовых масок. Цель работы заключалась в моделировании экологических процессов, возникающих в водоемах при колонизации вибрионами фрагментов пластика в виде медицинской маски в разные климатические сезоны. Для изучения способности микробной колонизации пластиковых субстратов при разных температурах в работе использовали токсигенные штаммы *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп разного происхождения, в качестве субстрата — три слоя медицинской маски. Методом ПЦР в режиме реального времени определена концентрация холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп в биопленках в динамике при теплых и холодных температурах. Установлено, что токсигенные штаммы образуют биопленки на всех слоях медицинской маски в первые дни при температуре 23 °С, больше — на среднем слое. При температуре 10 °С они сохраняются в биопленках весь срок эксперимента в жизнеспособном состоянии. Холерные вибрионы используют материал медицинских масок в виде абиотических субстратов для адгезии, колонизации и формирования биопленок с первых дней культивирования при температуре 23 °С. При уменьшении температуры культивирования до 10 °С отмечен период адаптации, равный одной неделе, проявляемый в виде небольшого снижения концентрации холерных вибрионов с последующим подъемом и длительным сохранением жизнеспособных клеток. Полученные данные свидетельствуют, что загрязнение водоемов материалом медицинских масок способно создавать новую экологическую нишу для размножения и сохранения токсигенных вибрионов во внешней среде.

**Ключевые слова:** холерный вибрион, биопленка, пластик, медицинская маска.

### Введение

Распространение холеры по странам мира (мониторинг 2010–2019) указывает на наличие постоянных рисков реализации водного пути распространения холерных вибрионов при заносе холеры [4]. В последние десятилетия нарастает информация о загрязнении вод Атлантического, Тихого, Индийского океанов [11, 12, 16], Балтийского моря [14], а также рек [15] пластиковым мусором, который имеет длительный период полураспада. Пластик имеет форму микропластинок (1–5 мм) с гидрофобной поверхностью, что способствует микробной колонизации и образованию биопленок, в том числе, холерных вибри-

онов [11, 14, 18, 20]. С началом пандемии коронавирусной инфекции во всем мире увеличилось использование пластиковых материалов в виде медицинских масок, при несоблюдении правил сбора и утилизации отработанные медицинские маски могут попасть во внешнюю среду. Согласно данным гонконгской организации Ocean Asia, только за 2020 год в моря и океаны попало около 1,56 млрд одноразовых масок [10]. Ранее экспериментально показана способность холерных вибрионов при комнатной температуре колонизировать поверхность стекла и пищевого пластика [7] и выживать в процессе межвидовой конкуренции [1, 3]. Это наблюдение подчеркивает возможную роль пластисферы в глобальном распространении морскими течениями вибрионов, колонизировавших поверхность пластиковых частиц [2].

Сведений о способности холерного вибриона колонизировать материал медицинских масок и выживать при низких температурах на абиотических субстратах в доступной литературе мы не встретили. Трехслойная маска состоит из двух наружных слоев «спанбонда» и внутреннего слоя «мельтблауна». «Спанбонд» — чрезвычайно прочный

© 2022 г. Титова С.В., Меньшикова Е.А., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Бородина О.В., Селянская Н.А.

\* **Автор для переписки:**

Титова Светлана Викторовна

кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории природно-очаговых инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

E-mail: svetatitova@bk.ru

материал из полипропилена, способный выдерживать значительные нагрузки и устойчивый к действию высоких и низких температур. «Мельтблаун» — это нетканый материал из очень мелких полипропиленовых волокон, выполняет основную фильтрующую функцию. Заявленные свойства полипропиленовой структуры маски позволяют допустить ее длительное сохранение в различном физическом виде в водоемах при различных условиях. Очевидно, что столь высокая концентрация во внешней среде нового потенциального субстрата для колонизации способна существенно изменить привычную экологию возбудителя.

Цель работы заключалась в моделировании экологических процессов, возникающих в водоемах при колонизации вибрионами фрагментов пластика в виде медицинской маски в разные климатические сезоны.

### Материалы и методы

В работе использовали три штамма разных по происхождению и выделению. *Vibrio cholerae* O1 El Tor, *ctxAB*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup>: 19613, выделен из воды поверхностного водоема, 19242, выделен от человека и *V. cholerae* O139, *ctxAB*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup> — 16065 клинического происхождения. Штаммы получены из лаборатории «Коллекция живых культур микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Экспериментальные пробы состояли из биопленочной и планктонной культур. Биопленки холерных вибрионов получали запатентованными способами, описанными ранее [7, 8]. В качестве твердого субстрата использовали пластик в виде изолированных фрагментов каждого из слоев медицинской маски диаметром 8 мм. Указанные фрагменты вырезали с помощью пробочного сверла, помещали во флаконы, содержащие 30 мл речной воды, и стерилизовали автоклавированием. Затем во флаконы добавляли суспензии холерных вибрионов, приготовленные из 18-часовой агаровой культуры по отраслевому стандарту мутности ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО-42-28-86), которую последовательно разводили до необходимой концентрации (конечная концентрация 10<sup>4</sup> м.к./мл). В качестве контроля использовали те же штаммы, которые инокулировали во флаконы с 30 мл речной автоклавированной воды без пластиковых субстратов.

Эксперименты проводили в двух температурных режимах. При комнатной температуре 23±2 °С считали условия, моделирующие температуру воды в водоемах в летний период, в течение четырех недель (одного месяца), далее экспериментальные и контрольные пробы переставляли в условия пониженной температуры. 10±2 °С считали моделью условий весны-осени. В этом

случае пробы дополнительно инкубировали в течение еще четырех недель. Через первые сутки и далее один раз в неделю концентрацию холерных вибрионов в планктоне и биопленках количественно оценивали методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Жизнеспособность культур определяли бактериологическим методом, для этого высевали 0,1 мл планктонной культуры на пластины с агаром Мартена (рН 7,6–7,8); биопленки на фрагментах полиуретановых слоев масок извлекали из флаконов, помещали на агаровые пластины и поэтапно отпечатывали на его поверхности, посеы инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 часов. Контролем служили пробы без субстратов, культивируемые в одинаковых условиях с экспериментальными пробами.

Количественное определение токсигенных холерных вибрионов проводили с помощью ПЦР-РВ по выявлению генов *ctx* [13]. С этой целью 0,5 мл взвеси планктонной формы помещали в пробирки типа «эппендорф» емкостью 1,5 мл; пластины с биопленками также помещали в пробирки, содержащие 0,5 мл деионизированной воды. Лизис клеток биопленки и планктонной формы проводили путем прогревания в течение 30 минут при 99 °С с последующим высевом для подтверждения стерильности [5]. В качестве стандарта использовали разведения взвеси *V. cholerae* O1 El Tor 19191 в серийных разведениях, обработанную аналогичным способом. Амплификацию проводили по следующей схеме: денатурация при 95 °С — 3 мин (1 цикл); затем 35 циклов: денатурация при 95 °С — 20 с, отжиг и регистрация при 60 °С — 20 с, синтез при 72 °С — 20 с. Количественный учет осуществляли согласно инструкции производителя [6].

Все работы проводили согласно СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Накопление, корректировка, систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016, используя десятичный логарифм. Статистический анализ проводился с использованием программы Medstatistica.ru. Полученные данные объединяли в вариационные ряды, в которых проводили расчет средних арифметических величин (*M*), в качестве ошибки среднего представляли стандартное отклонение (*σ*) и относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации, CV) [9]. Статистическую значимость различий экспериментальных данных оценивали с помощью критерия Стьюдента. Если концентрация холерных вибрионов была в пределах одного порядка, то эти значения оценивали как идентичные.

## Результаты и обсуждение

На территории Российской Федерации в последнее десятилетие выделяли холерные вибрионы, в основном нетоксигенные штаммы и единичные токсигенные штаммы в летний период из воды поверхностных водоемов. Поэтому для решения поставленной цели начальную температуру культивирования экспериментальных и контрольных проб выбрали  $23\pm 2$  °С как пример предполагаемого контаминирования холерными вибрионами

речной воды, содержащей фрагменты микропластика в летний период.

При изучении способности холерных вибрионов колонизировать материал медицинских масок в различных условиях эксперимента в качестве абиотического субстрата отдельно использовали каждый из трех слоев материала медицинской маски. Полученные данные свидетельствуют о сохранении холерных вибрионов токсигенных штаммов O1 и O139 серогрупп при температурах  $23\pm 2$  и  $10\pm 2$  °С на полимерном матриксе (рис. 1).

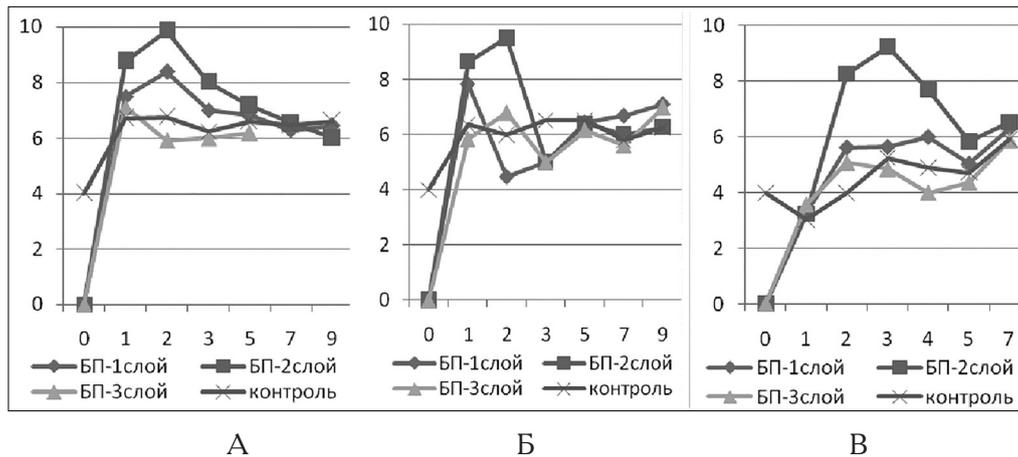


Рис. 1. Концентрация холерных вибрионов в биопленках на полимерных материалах (медицинская маска) в динамике при температуре  $23\pm 2$  °С и  $10\pm 2$  °С. А) *V. cholerae* O139-16065; Б) *V. cholerae* O1 E1 Tor 19613; В) *V. cholerae* O1 E1 Tor 19242. Примечание: ось X — время эксперимента (недели). Ось Y — концентрация *V. cholerae* (Log м.к./мл). Температура  $23\pm 2$  °С с 1 до 4 недели. Температура  $10\pm 2$  °С с 5 до 9 недели

Как видно из данных рисунка 1 А, Б, В, при температуре культивирования  $23\pm 2$  °С нарастание концентрации клеток холерных вибрионов наблюдалось у штаммов *V. cholerae* O1 E1 Tor 19613 и *V. cholerae* O139 16065 в течение двух недель и у *V. cholerae* O1 E1 Tor 19242 — на третьей. Пик концентрации 9,5—9,8—9,2 Log м.к./мл отмечен в пробах со вторым слоем медицинской маски «мельтблаун», состоящим из нетканых очень мелких полипропиленовых волокон, что, возможно, обусловлено большей удельной поверхностью субстрата. Далее наблюдали снижение концентрации до 6,0—7,0 Log м.к./мл через три и четыре недели от начала культивирования. С пятой недели пробы переносили в условия пониженной температуры ( $10\pm 2$  °С). Отмечено сохранение концентрации *V. cholerae* O1 E1 Tor 19613 и O139 16065, значения ее были в пределах 5,0—7,1 Log м.к./мл. В образцах со штаммом *V. cholerae* O1 E1 Tor 19242 отмечены более резкие пики подъема и снижения концентрации, доходящие до значений — 4,0 Log м.к./мл. Однако с седьмой недели концентрация холерных вибрионов так же, как и у предыдущих проб, выровнялась и составляла 6,0—6,5 Log м.к./мл.

При отпечатывании фрагментов полимерного материала трех слоев медицинской маски подтверждено жизнеспособное состояние холерных вибрионов в пробах на всех субстратах в виде типичного роста культуры на агаре Мартена. Учитывая наши предварительные данные [1], это наблюдение позволило ориентировочно предположить, что концентрация микробных клеток на фрагментах медицинской маски составляла порядка  $10^6$  м.к. на  $\text{см}^2$  поверхности объекта.

При культивировании холерных вибрионов при температуре  $23\pm 2$  °С в экспериментальных пробах через сутки отмечена адгезия клеток холерных вибрионов изучаемых штаммов ко всем слоям маски и формирование биопленки. Рост концентрации клеток происходил в течение двух недель с характерной особенностью: самая высокая концентрация холерных вибрионов наблюдалась со вторым промежуточным слоем «Мельтблаун», что превышало на четыре порядка их показатель для контрольных проб. Концентрация холерных вибрионов на первом и третьем слоях была примерно одинаковой у всех исследуемых штаммов с разницей на два порядка на протяжении одной недели. С понижением температуры до  $10\pm 2$  °С наблюдалось снижение

содержания холерных вибрионов во всех пробах до значений  $6,0 \text{ Log м.к./мл}$ . У *V. cholerae* O139 отмечено плавное понижение концентрации. У двух штаммов *V. cholerae* O1 E1

Тог резкое снижение концентрации с подъемом через две недели. До конца эксперимента концентрация холерных вибрионов держалась на уровне  $6,0 \text{ Log м.к./мл}$ .

Таблица 1

**Результаты подсчета средней концентрации клеток штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп в экспериментальных на биопленках из материала «медицинская маска» и контрольных пробах без субстратов**

Время недели	Средняя концентрация клеток <i>V. cholerae</i> и стандартное отклонение $M \pm \sigma$ , м.к./мл; (CV)					
	<i>V. cholerae</i> O139		<i>V. cholerae</i> O1			
	16065		19613		19242	
	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль
1	$7,79 \pm 0,87$ 11,16%	$6,7 \pm 0,10$ 1,49%	$7,43 \pm 1,44$ 19,42%	$6,38 \pm 0,10$ 1,57%	$3,36 \pm 0,19$ 5,54%	$3,00 \pm 0,5$ 16,67%
2	$8,05 \pm 2,00$ 24,87%	$6,7 \pm 0,10$ 1,49%	$6,93 \pm 2,52$ 36,34%	$6,00 \pm 0,2$ 3,33%	$6,31 \pm 1,7$ 26,92%	$4,00 \pm 0,2$ 5,00%
3	$7,00 \pm 1,00$ 14,29%	$6,20 \pm 0,10$ 1,61%	$5,00 \pm 0,00$ 0,00%	$6,5 \pm 0,1$ 1,54%	$6,57 \pm 2,34$ 35,59%	$5,25 \pm 0,10$ 1,9%
5	$6,71 \pm 0,51$ 7,53%	$6,60 \pm 0,10$ 1,52%	$6,34 \pm 0,15$ 2,39%	$6,5 \pm 0,1$ 1,54%	$5,90 \pm 1,85$ 31,33%	$4,83 \pm 0,09$ 1,88%
7	$6,28 \pm 0,27$ 4,23%	$6,46 \pm 0,02$ 0,31%	$6,10 \pm 0,54$ 8,89%	$5,7 \pm 0,1$ 1,75%	$5,07 \pm 0,73$ 14,4%	$4,72 \pm 0,10$ 2,12%
9	$6,15 \pm 0,25$ 4,13%	$6,60 \pm 0,10$ 1,52%	$6,79 \pm 0,46$ 6,72%	$6,25 \pm 0,25$ 4,00%	$6,23 \pm 0,32$ 5,15%	$5,9 \pm 0,10$ 1,70%
$\Sigma$	$7 \pm 0,78$ 11,17%	$6,54 \pm 0,19$ 2,90%	$6,43 \pm 0,84$ 13,09%	$6,22 \pm 0,32$ 5,09%	$5,57 \pm 1,20$ 21,57%	$4,62 \pm 1,01$ 21,87%

Примечание:  $\Sigma$  — среднее количество концентрации клеток и стандартное отклонение  $M \pm \sigma$ , м.к./мл; (CV %) *V. cholerae* за 9 недель.

Как следует из данных таблицы 1, несмотря на некоторые различия средних значений концентрации холерных вибрионов во всех исследуемых пробах между разными штаммами или экспериментальными и контрольными (планктонными) пробами одного штамма, значение t-критерия Стьюдента, рассчитанное по экспериментальным данным, не превышает табличное значение для штаммов *V. cholerae* O139 ( $t_{\text{эксп.}} = 1,28$  для исследуемых проб, не превышает критическое (табличное)  $t_{\text{табл.}} = 2,228$ ), при уровне значимости  $p = 0,05$ , и числа степеней свободы  $f = 10$ . Для штамма *V. cholerae* O1 19613 ( $t_{\text{эксп.}} = 0,52$  для исследуемых проб *V. cholerae* O1 19613 не превышает критическое (табличное)  $t_{\text{табл.}} = 2,228$ ). Следовательно, наблюдаемые различия статистически незначимы и концентрация клеток холерных вибрионов в экспериментальных (биопреночных) и контрольных (планктонных) формах находятся в пределах одного порядка. При сравнении штаммов O1 и O139 серогрупп в биопреночной форме на пластиковом субстрате, в том числе и из материалов медицинской маски, между собой также различия были не значимы. Это означает, что холерные вибрионы O1 и O139 серогруппы образуют биопренки однотипно и способны выживать на пластиковом субстрате при «теплых» и «холодных» температурах культивирования.

## Заключение

Пластик имеет более длительный период полураспада, чем большинство естественных плавающих морских субстратов, и гидрофобную поверхность, которая способствует микробной колонизации и образованию биопренки [20].

В наших экспериментах холерные вибрионы используют материал медицинских масок в виде абиотических субстратов для адгезии, колонизации и формирования биопренок с первых дней культивирования при температуре  $23 \pm 2$  °C. Это видно и по концентрации клеток, определяемой ПЦР-РВ, которая была не менее  $4,0 \text{ Log м.к./мл}$ . При этом срок выживания составлял один месяц (срок наблюдения).

При уменьшении температуры культивирования с  $23 \pm 2$  до  $10 \pm 2$  °C отмечен период адаптации, равный одной неделе, проявляемый в виде небольшого снижения концентрации холерных вибрионов, с последующим подъемом и длительным сохранением жизнеспособных клеток.

Экспериментально обнаружены повышенная адгезия, колонизация и формирование биопренки холерными вибрионами в течение первых двух недель полипропиленового материала, используемого в трехслойных

медицинских масках «Мельтблауна» и «Саномекса». Концентрация холерных вибрионов в течение первой недели инкубации достигала значений до 9,0 Log м.к./мл и более с дальнейшим плавным снижением. В связи с тем, что холерные вибрионы колонизируют пластиковые поверхности сразу, можно предположить, что они являются «ранними» колонизаторами, от которых в дальнейшем зависит формирование сообщества биопленки. Подтверждением этому является информация о семействе *Vibrionaceae* как представителях микробного мира, способных формировать биопленки на ранних стадиях (0–9 часов) [17].

Проблема пластикового загрязнения вод мирового океана стала настолько актуальной, что многие ученые начали изучать разные виды пластика на контаминацию их микроорганизмами [19]. Полученные нами данные свидетельствуют, что загрязнение водоемов материалом медицинских масок способно создавать новую экологическую нишу для размножения и сохранения токсигенных вибрионов во внешней среде.

## Литература

1. Водопьянов С.О., Титова С.В., Водопьянов А.С., Веркина Л.М., Олейников И.П., Писанов Р.В., Лысова Л.К., Селянская Н.А., Рыковская О.А. Изучение межвидовой конкуренции *Vibrio cholerae* в биопленках // Здоровье населения и среда обитания. — 2017. — № 3(288). — С. 51–547.
2. Водопьянов С.О., Титова С.В., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Клешина О.В., Москвитина Э.А. Пластисфера как возможный фактор глобального распространения *V. cholerae* (материал для подготовки лекции) // Инфекционные болезни. — 2018. — Т. 7. — № 3. — С. 109–113.
3. Водопьянов С.О., Титова С.В., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Лысова Л.К. Анализ внутривидовой конкуренции *Vibrio cholerae* в биопленках // Известия ВУЗ Сев.-Кав. Региона. Естественные науки. — 2016. — № 1. — С. 49–53.
4. Москвитина Э.А., Янович Е.Г., Куриленко М.Л., Кругликов В.Д., Титова С.В., Левченко Д.А., Водопьянов А.С., Лопатин А.А., Иванова С.М., Мишанькин Б.М., Кривенко А.С., Анисимова Г.Б., Носков А.К. Холера: мониторинг эпидемиологической обстановки в мире и России (2010–2019 гг.). Прогноз на 2020 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2020. — № 2. — С. 38–47.
5. Патент 2685878 Российская Федерация, МПК 51 С12Н 11/00 (2006.01). Способ моделирования биопленок, формируемых *Vibrio cholerae* O1 серогруппы на поверхности хитина / Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Титова С.В.; заявитель и патентообладатель ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. — № 2018103604; заявл. 30.01.18; опубл. 23.04.19, Бюл. N 12. — 12 с.: ил.
6. Руководство по эксплуатации. Амплификатор детектирующий ДТлайт. ЧАСТЬ I. Работа с прибором. ТУ 9443-003-96301278-2010. — С. 50.
7. 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 лабораторная диагностика. — 2016. — № 61(4). — С. 238–241.
8. Титова С.В., Кушнарёва Е.В. Оценка способности холерных вибрионов к образованию биопленок *in vitro* с помощью нового методического подхода // Фундаментальные исследования. — 2014. — № 10. — С. 375–379.
9. Фадейкина О.В., Касина И.В., Ермолаева Т.Н., Волкова Р.А., Давыдов Д.С., Немировская Т.И., Климов В.И., Борисевич И.В., Мовсесянц А.А. Проблемы оценки общей концентрации микробных клеток с применением отраслевого стандартного образца мутности бактериальных взвесей // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2016. — № 11. — С. 268–273.
10. Bondaroff T.P. Masks on the beach. The impact of COVID-19 on Marine Plastic Pollution. — OceansAsia, 2020. URL: <https://oceansasia.org/wp-content/uploads/2020/12/Marine-Plastic-Pollution-FINAL-1.pdf>.
11. Curren E., Leong S.Ch.Y. Profiles of bacterial assemblages from microplastics of tropical coastal environments // Science of the total environment. — 2019. — Vol. 655. — P. 313–320.
12. Hirai H., Takada H., Ogata Y., Yamashita R., Mizukawa K., Saha M., Kwan C., Moore C., Gray H., Laursen D., Zettler E.R., Farrington J.W., Reddy C.M., Peacock E.E., Ward M.W. Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches // Mar. Pollut. Bull. — 2011. — Vol. 62(8). — P. 1683–1692.
13. Huang J., Zhu Y., Wen H. Quadruplex real-time PCR assay for detection and identification of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains and determination of their toxigenic potential // Appl. Environ. Microbiology. — 2009. — Vol. 75(22). — P. 6981–6985.
14. Keszy K., Labrenz M., Scales B.S., Kreikemeyer B., Oberbeckmann S. *Vibrio* colonization is highly dynamic in early microplastic-associated biofilms as well as on field-collected microplastics // Microorganisms. — 2021. — Vol. 9. — Art. 76. doi: 10.3390/microorganisms9010076.
15. Metcalf R., White H.L., Moresco V., Ormsby M.J., Oliver D.M., Quilliam R.S. Sewage-associated plastic waste washed up on beaches can act as a reservoir for faecal bacteria, potential human pathogens, and genes for antimicrobial resistance // Marine Pollution Bulletin. — 2022. — Vol. 180. — Art. 113766. doi: 10.1016/j.marpolbul.2022.113766.
16. Oberbeckmann S., Labrenz M. Marine microbial assemblages on microplastics: diversity, adaptation, and role in degradation // Ann. Rev. Mar. Sci. — 2020. — Vol. 12. — P. 209–232.

17. Rajeev M., Sushmitha T.J., Toleti S.R., Pandian S.K. Culture dependent and independent analysis and appraisal of early stage biofilm-forming bacterial community composition in the Southern coastal seawater of India // *Sci. Total Environ.* – 2019. – Vol. 666. – P. 308–320.
18. Silva M.M., Maldonado G.C., Castro R.O., Felizardo J.de Sá, Cardoso R.P., Anjos R.M., Araújo F.V. Dispersal of potentially pathogenic bacteria by plastic debris in Guanabara Bay, RJ, Brazil // *Marine Pollution Bulletin.* – 2019. – Vol. 141. – P. 561–568.
19. Vaksmaa A., Knittel K., AbdalaAsbun A., Goudriaan M., Ellrott A., Witte H.J., Vollmer I., Meirer F., Lott C., Weber M., Engelmann J.C., Niemann H. Microbial communities on plastic polymers in the Mediterranean Sea // *Front. Microbiol.* – 2021. – Vol. 12. – Art. 673553. doi: 10.3389/fmicb.2021.673553.
20. Zettler E.R., Mincer T.J., Amaral-Zettler L.A. Life in the «Plastisphere»: microbial communities on plastic marine debris // *Environ. Sci. Technol.* – 2013. – Vol. 47(13). – P. 7137–7146.
7. Titova SV, Verkina LM. Modelirovaniye bioplenok kholernogo vibriona na tverdykh poverkhnostyakh (steklo i plastik) i vizualizatsiya ikh v svetovom i lyuminestentnom mikroskopakh. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2016; 61(4):238–241 (in Russian).
8. Titova SV, Kushnareva YeV. Otsenka sposobnosti kholernykh vibriionov k obrazovaniyu bioplenok in vitro s pomoshch'yu novogo metodicheskogo podkhoda. *Fundamental'nyye issledovaniya* 2014; 10:375–379 (in Russian).
9. Fadeykina OV, Kasina IV, Yermolayeva TN, Volkova RA, Davydov DS, Nemirovskaya TI, Klimov VI, Borisevich IV, Movsesyants AA. Problemy otsenki obshchey kontsentratsii mikrobnyykh kletok s primeneniym otraslevogo standartnogo obraztsa mutnosti bakterial'nykh vzvesey. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy* 2016; 11:268–273 (in Russian).
10. Bondaroff TP. Masks on the beach. The impact of COVID-19 on Marine Plastic Pollution. *OceansAsia*, 2020. URL: <https://oceansasia.org/wp-content/uploads/2020/12/Marine-Plastic-Pollution-FINAL-1.pdf>
11. Curren E, Leong SCHY. Profiles of bacterial assemblages from microplastics of tropical coastal environments. *Science of the total environment* 2019; 655:313–320.
12. Hirai H, Takada H, Ogata Y, Yamashita R, Mizukawa K, Saha M, Kwan C, Moore C, Gray H, Laursen D, Zettler ER, Farrington JW, Reddy CM, Peacock EE, Ward MW. Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches. *Mar Pollut Bull* 2011; 62(8):1683–1692.
13. Huang J, Zhu Y, Wen H. Quadruplex real-time PCR assay for detection and identification of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains and determination of their toxigenic potential. *Appl Environ Microbiology* 2009; 75(22):6981–6985.
14. Keszy K, Labrenz M, Scales BS, Kreikemeyer B, Oberbeckmann S. *Vibrio* colonization is highly dynamic in early microplastic-associated biofilms as well as on field-collected microplastics. *Microorganisms* 2021; 9:76. doi: 10.3390/microorganisms9010076.
15. Metcalf R, White HL, Moresco V, Ormsby MJ, Oliver DM, Quilliam RS. Sewage-associated plastic waste washed up on beaches can act as a reservoir for faecal bacteria, potential human pathogens, and genes for antimicrobial resistance. *Marine Pollution Bulletin* 2022; 180:113766. doi: 10.1016/j.marpolbul.2022.113766.
16. Oberbeckmann S, Labrenz M. Marine microbial assemblages on microplastics: diversity, adaptation, and role in degradation. *Ann Rev Mar Sci* 2020; 12:209–232.
17. Rajeev M, Sushmitha TJ, Toleti SR, Pandian SK. Culture dependent and independent analysis and appraisal of early stage biofilm-forming bacterial community composition in the Southern coastal seawater of India. *Sci Total Environ* 2019; 666:308–320.

## References

1. Vodop'yanov SO, Titova SV, Vodop'yanov AS, Verkina LM, Oleynikov IP, Pisanov RV, Lysova LK, Selyanskaya NA, Rykovskaya OA. Izucheniye mezhvidovoy konkurentsii *Vibrio cholerae* v bioplenkakh. *Zdorov'ye naseleniya i sreda obitaniya* 2017; 3(288):51–547 (in Russian).
2. Vodop'yanov SO, Titova SV, Vodop'yanov AS, Oleynikov IP, Kleshnina OV, Moskvitina EA. Plasticsfera kak vozmozhnyy faktor global'nogo rasprostraneniya *V. cholerae* (material dlya podgotovki lektsii). *Infektsionnyye bolezni* 2018; 7(3):109–113 (in Russian).
3. Vodop'yanov SO, Titova SV, Vodop'yanov AS, Oleynikov IP, Lysova LK. Analiz vnutrividovoy konkurentsii *Vibrio cholerae* v bioplenkakh. *Izvestiya VUZ Sev-Kav Regiona. Yestestvennyye nauki* 2016; 1:49–53 (in Russian).
4. Moskvitina EA, Yanovich YeG, Kurilenko ML, Kruglikov VD, Titova SV, Levchenko DA, Vodop'yanov AS, Lopatin AA, Ivanova SM, Mishan'kin BM, Krivenko AS, Anisimova GB, Noskov AK. Kholera: monitoring epidemiologicheskoy obstanovki v mire i Rossii (2010–2019 gg). *Prognoz na 2020 g. Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2020; 2:38–47 (in Russian).
5. Patent 2685878 Rossiyskaya Federatsiya, MPK 51 S12N 11/00 (2006.01). Sposob modelirovaniya bioplenok, formiruyemykh *Vibrio cholerae* O1 serogruppy na poverkhnosti khitina / Vodop'yanov SO, Vodop'yanov AS, Men'shikova YeA, Kurbatova YeM, Titova SV; zayavitel' i patentoobladatel' FKUZ Rostovskiy-na-Donu protivochumnyy institut Rospotrebnadzora. № 2018103604; zayavl 30.01.18; opubl 23.04.19, Byul N 12. 12 s: il (in Russian).
6. Rukovodstvo po ekspluatatsii. Amplifikator detektiruyushchiy DTlayt. CHAST' I. Rabota s priborom. TU 9443-003-96301278-2010: 50 (in Russian).

18. Silva MM, Maldonado GC, Castro RO, Felizardo Jde Sá, Cardoso RP, Anjos RM, Araújo FV. Dispersal of potentially pathogenic bacteria by plastic debris in Guanabara Bay, RJ, Brazil. *Marine Pollution Bulletin* 2019; 141:561–568.
19. Vaksmaa A, Knittel K, AbdalaAsbun A, Goudriaan M, Ellrott A, Witte HJ, Vollmer I, Meirer F, Lott C, Weber M, Engelmann JC, Niemann H. Microbial communities on plastic polymers in the Mediterranean Sea. *Front Microbiol* 2021; 12:673553. doi: 10.3389/fmicb.2021.673553.
20. Zettler ER, Mincer TJ, Amaral-Zettler LA. Life in the «Plastisphere»: microbial communities on plastic marine debris. *Environ Sci Technol* 2013; 47(13):7137–7146.

## EXPERIMENTAL MODELING OF BIOFILMS OF *VIBRIO CHOLERAE* O1 AND O139 SEROGROUPS ON A PLASTIC SUBSTRATE OF MEDICAL MASK MATERIAL

S.V. TITOVA, E.A. MENSHIKOVA, S.O. VODOP'YANOV, I.P. OLEJNIKOV,  
O.V. BORODINA, N.A. SELYANSKAYA

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

Experimental data on the colonization of the surface of glass and food-grade plastic by choleric vibrios emphasize the role of the plastisphere in the global spread of vibrios colonizing these surfaces by sea currents. According to the Hong Kong-based organization Ocean Asia, about 1.56 billion disposable masks fell into the seas and oceans in 2020. The aim of the work was to model the ecological processes that occur in reservoirs during the colonization by vibrios of plastic fragments in the form of a medical mask in different climatic seasons. To study the ability of microbial colonization of plastic substrates at different temperatures, toxigenic strains of *V. cholerae* O1 and O139 serogroups of different origin were used in the work, three layers of a medical mask were used as a substrate. The concentration of cholera vibrios of O1 and O139 serogroups in biofilms in dynamics at warm and cold temperatures was determined by real-time PCR. It was found that toxigenic strains form biofilms on all layers of the medical mask in the first days at a temperature of 23 °C more on the middle layer. At a temperature of 10 °C, they are stored in biofilms for the entire duration of the experiment in a viable state. Cholera vibrios use the material of medical masks in the form of abiotic substrates for adhesion, colonization and formation of biofilms from the first days of cultivation at a temperature of 23 °C. With a decrease in the cultivation temperature to 10 °C, an adaptation period of one week was noted, manifested in the form of a slight decrease in the concentration of cholera vibrios, followed by a rise and long-term preservation of viable cells. The data obtained indicate that contamination of reservoirs with the material of medical masks can create a new ecological niche for the reproduction and preservation of toxigenic vibrios in the external environment.

*Keywords:* *Vibrio cholerae*, biofilm, plastic, medical mask.

### Address:

Titova S.V., Ph.D.  
leading researcher, laboratory of natural focal infections,  
Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor  
E-mail: svetatitova@bk.ru

### Для цитирования:

Титова С.В., Меньшикова Е.А., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Бородин О.В., Селянская Н.А. Экспериментальное моделирование биопленок *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогруппы на пластиковом субстрате материала медицинской маски. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(4):32–38.

### For citation:

Titova S.V., Menshikova E.A., Vodop'yanov S.O., Oleynikov I.P., Borodina O.V., Selyanskaya N.A. Experimental modeling of biofilms of *Vibrio cholerae* O1 and O139 serogroups on a plastic substrate of medical mask material. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2022; 18(4):32–38 (in Russian).

# РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА SOX2 ТРАНСКРИПЦИОННЫМИ ФАКТОРАМИ В НЕЙРОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ

Е.В. ЛАПТЕНКОВА<sup>1,2</sup>, П.М. ГОТОВЦЕВ<sup>1,2\*</sup>, Р.Г. ВАСИЛОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»*,

<sup>2</sup> *Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)*

Sox2 — транскрипционный фактор, критически важный для развития млекопитающих и играющий значительную роль в самых разных биологических процессах. В нервной системе Sox2 поддерживает самообновление нейрональных стволовых клеток, что существенно как для пренатального развития, так и для взрослого нейрогенеза. При этом его воздействие дозозависимо и нуждается в тонкой регуляции. В данном обзоре собрана информация о результатах и механизмах действия ключевых транскрипционных факторов на экспрессию Sox2 в нейрональных стволовых клетках и предложены возможные направления дальнейших исследований.

**Ключевые слова:** Sox2, регуляция, транскрипционные факторы, нейрональные стволовые клетки, дифференцировка нейронов, обзоры.

## Введение

Ген Sox2 является транскрипционным фактором, регулирующим множество разных процессов как во время развития, так и во взрослом организме. Он необходим для поддержания плюрипотентности стволовых клеток, в частности, нейрональных стволовых клеток [45]. Помимо контроля развития нервной системы, Sox2 регулирует и другие клеточные линии эктодермального происхождения — внутреннее ухо, хрусталик, обонятельную систему [5, 10, 31]. Также была выявлена роль Sox2 в формировании некоторых структур, происходящих из энтодермы (вкусовые рецепторы [28] и легкие [8]). Примечательно, что Sox2 служит одним из четырех факторов Яманаки [37] — транскрипционных факторов, запускающих ряд процессов, которые способствуют превращению соматических клеток в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

В развивающейся нервной системе Sox2 активен в нейрональных стволовых клетках и важен для их самообновления; дифференцировка в нейроны и глию обычно происходит при подавлении экспрессии Sox2. Таким образом, на протяжении дифференцировки нейронального

предшественника Sox2 присутствует на всех стадиях вплоть до превращения клетки в нейробласт, после чего концентрация данного транскрипционного фактора резко снижается. Это необходимо для дальнейшей дифференцировки клетки [33]. Было подтверждено, что Sox2 влияет на пролиферацию и дифференцировку клеток-предшественников ЦНС и периферической нервной системы на протяжении всего онтогенеза — как эмбрионального, так и постэмбрионального [23, 29]. При этом роль Sox2 в нейрогенезе крайне важна. Мутации Sox2 у людей приводят к целому ряду дефектов нервной системы, включая нарушение зрения, контроля движений и познания [23]. Для развития, как минимум, двух областей конечного мозга — гиппокампа и ганглионарного возвышения — функциональный Sox2 критически необходим [24].

Помимо регуляции нормального развития организма, Sox2 контролирует и некоторые патологические процессы, в частности, патогенез рака. Нарушение регуляции экспрессии Sox2 связано с множеством типов рака. Sox2 экспрессируется в раковых стволовых клетках, регулируя такие процессы, как пролиферация, эпителиально-мезенхимальный переход, миграция, инвазия, метастазирование, образование сфер и колоний, инициация опухоли, образование раковых стволовых клеток, а также устойчивость к апоптозу и терапии [27].

Sox2 опосредует устойчивость к установленным методам лечения рака, и он экспрессируется в раковых стволовых клетках. Эти результаты показывают, что изучение роли Sox2 в контексте прогрессирования рака

может привести к разработке новых терапевтических возможностей.

Активное, а иногда и существенно необходимое участие Sox2 в различных биологических процессах делает изучение возможных методов воздействия на его экспрессию важной и перспективной задачей, результаты которой могут найти применение в терапии нейродегенеративных и раковых заболеваний [6, 27].

### Общие сведения о гене Sox2

Sox2 — лишенный интронов ген, состоящий из одного экзона и находящийся в хромосоме 3q26.3-q27. Этот ген находится внутри интрона другого гена, называемого overlapping transcript Sox2 (SOX2OT). Sox2 кодирует белок длиной 317 аминокислот [34]. Ген Sox2 принадлежит к семейству транскрипционных факторов SOX, которое регулирует многие стадии развития млекопитающих. Все гены-члены семейства SOX происходят от SRY и имеют общий высоко консервативный ДНК-связывающий домен, известный как домен высокой мобильности и состоящий из примерно 80 аминокислот. Этот домен позволяет им специфично связываться с ДНК и действовать как транскрипционные факторы. Среди генов семейства SOX выделяют подгруппу SoxB1, содержащую три гена, функции которых частично пересекаются; к SOXB1 относится и ген Sox2. Примечательно, что гены этой подгруппы очень консервативны [2].

В отличие от большинства ДНК-связывающих белков, SOX-белки взаимодействуют с малой бороздкой и после связывания вносят в ДНК сильные изгибы. Следовательно, белки SOX действуют как архитектурные белки, формируя регуляторные области генов и обеспечивая установление физических контактов между TF, связанными с одним и тем же промотором или энхансером гена-мишени. SOX TF выполняют регуляторные функции путем активации или репрессии транскрипции генов только посредством специфических взаимодействий с партнерским фактором(ами) и путем установления контактов с основным аппаратом транскрипции [33].

### Регуляция гена Sox2 транскрипционными факторами

Как обсуждалось выше, продукт гена Sox2 вовлечен во множество жизненно важных процессов в организме, особенно в нервной ткани. При этом он действует дозозависимым образом: сообщалось, что сверхэкспрессия Sox2 как в мышечных, так и в куриных эмбриональных

нейрональных клетках-предшественниках приводит к поддержанию популяции Sox2+ и дефектному нейрогенезу [12], а снижение функции Sox2 в нейрональных предшественниках приводит к сокращению их количества и сниженной или aberrантной дифференцировке, в зависимости от типа ткани и степени снижения функции Sox2 [12]. В эмбриональных стволовых клетках как излишне высокая, так и низкая экспрессия Sox2 могут приводить к потере плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток [20]. Как следствие, чтобы поддерживать уровень экспрессии в сбалансированном уровне, механизм ее регуляции у Sox2 должен быть тонким и достаточно чувствительным.

Известно о многих способах регуляции экспрессии Sox2 в клетках мозга — микроРНК, сигнальные пути, посттрансляционные модификации и так далее. В данной работе основной акцент сделан на один определенный механизм регуляции экспрессии Sox2 — транскрипционные факторы. Ниже описаны транскрипционные факторы, роль которых в регуляции Sox2 подтверждена по результатам различных исследований.

Sox4 и Oct4 взаимодействуют между собой, что позволяет обеспечить более тонкую регуляцию экспрессии Sox2: сообщалось, что транскрипционный фактор Sox4 из того же семейства генов SOX регулирует экспрессию Sox2 через сигнальный путь TGF- $\beta$ , формируя объединенный комплекс с Oct4 и воздействуя на промотор Sox2 [11].

Msx2 — член семейства гомеобоксных генов мышечного сегмента. Кодированный им белок является репрессором транскрипции (в частности — для гена Sox2), нормальная активность которого может устанавливать баланс между выживанием и апоптозом клеток, происходящих из нервного гребня, необходимый для правильного черепно-лицевого морфогенеза. Msx2 может также играть роль в стимулировании роста клеток при определенных условиях и может быть важной мишенью для сигнальных путей RAS. Промотор Msx2 содержит консервативный BMP-ограниченный Smad-связывающий элемент, называемый BMP-чувствительным элементом (BMP — bone morphogenetic proteins или костных морфогенетических белков), состоящий из 52 пар нуклеотидов [4]. Наличие этого элемента объясняет возможность регуляции экспрессии Msx2 с помощью сигналов BMP, которые, кроме того, регулируют развитие нервной системы многими другими способами [9]. Сообщалось, что передача сигналов BMP напрямую активирует Msx2 и может синергически усиливаться действием сигнального пути WNT за счет транскрипционного медиатора пере-

дачи сигналов LEF1 и, вероятно, белков семейства Smad [44]. Примечательно, что была показана способность транскрипционного фактора Foxc1 изменять пороговый уровень сигнала BMP, необходимый для активации Msx2, — по крайней мере, в зачатке лобной кости мыши [35].

P21 — ингибитор циклин-зависимой киназы — подавляет экспрессию Sox2, напрямую связываясь с энхансером данного гена [21].

Регулируемый сигналами BMP и другими факторами, Msx2 связывается напрямую с промотором Sox2, в значительной степени подавляя его транскрипцию. Характерно, что Sox2 может способствовать деградации белка Msx2 через протеасомный путь — как минимум в плюрипотентных стволовых клетках, — образуя петлю отрицательной обратной связи между двумя транскрипционными факторами. Это может быть объяснением того факта, что Sox2 способен экспрессироваться в тех же клетках, где наблюдается экспрессия Msx2 [44].

Было показано, что относительно хорошо изученные транскрипционные факторы AP2, Pax6 и Pгох1 служат активаторами и, как и Msx2, связываются напрямую с промотором Sox2. Эти три транскрипционных фактора заметно усиливают экспрессию Sox2 и часто экспрессируются в тех же областях, что и регулируемый ими ген [14]. Сайты связывания всех перечисленных транскрипционных факторов находятся в области промотора Sox2 и схематично изображены на рисунке 1.

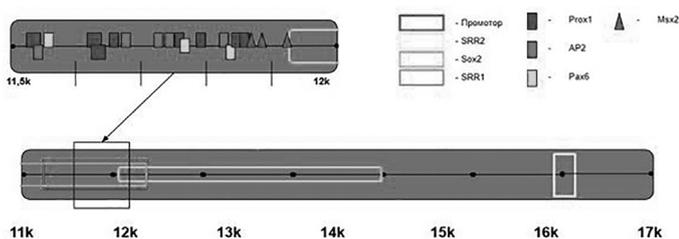


Рис. 1. Сайты связывания транскрипционных факторов AP2, PAX6 и Pгох1

Транскрипционный фактор Pгох1 вовлечен во множество важных событий в нейрогенезе гиппокампа, в частности, он необходим для поддержания промежуточных нейрональных предшественников. Механизм, с помощью которого Pгох1 выполняет свои функции, включает в себя отдельные сигнальные пути, в настоящее время полностью не выясненные. Одна из функций Pгох1 — регуляция экспрессии Sox2 за счет связывания с его промотором в нескольких областях и усиления его транскрипции. Экспрессия Pгох1, в основном, регулируется механизмами, представленными в таблице 1 [32].

Таблица 1

**Механизм регуляции функций транскрипционного фактора Pгох1**

Механизм регуляции	Тип регуляции
Сигнальный путь WNT	Активация Pгох1
МикроРНК miR-181a	Подавление Pгох1
Сигнальный путь Notch1	Подавление Pгох1
Транскрипционные факторы Mash/Ngn2	Активация Pгох1
Транскрипционный фактор Sox1	Подавление Pгох1
Транскрипционный фактор Stau2	Подавление Pгох1
Транскрипционный фактор Olig2	Подавление Pгох1

Обращая внимание на схематичное расположение сайтов связывания белка Pгох1 на промоторе Sox2 (см. рис. 1), следует заметить, что их количество велико относительно трех других факторов транскрипции. Можно сделать предположение, что положение сайта связывания Pгох1 может влиять на эффективность взаимодействия с Sox2, однако на данный момент нет опубликованных исследований этого вопроса.

Pax6 — это высококонсервативный фактор транскрипции среди позвоночных. Он важен для различных аспектов развития центральной нервной системы. В настоящее время установлено, что Pax6 необходим для поддержания пула нейрональных стволовых клеток и, таким образом, для регуляции нейрогенеза как у эмбрионов, так и у взрослых. Pax6 и Sox2 совместно занимают относительно большой набор промоторов генов, что предполагает потенциальную кооперативность между этими двумя факторами транскрипции в регуляции генов [1]. В частности, Pax6, соединяясь с промотором Sox2, ведет к увеличению экспрессии последнего [42].

Экспрессия Pax6 регулируется множеством микроРНК и многими факторами транскрипции [1, 36, 39]. Подтверждено, что Pax6, взаимодействуя с Sparg и p53, способен к Smad-зависимой авторегуляции [30]. MDIA модулирует активность Pax6 в раннем развитии нейронов, HOMER3, DNCL1 и TRIM11 взаимодействуют с Pax6 во время синаптической активации и нейронной транскрипционной активности. Домен MN1 Smad3 взаимодействует с Pax6 и репрессирует ауторегуляцию его промотора P1. Оказавшись в ядре, Smad3 взаимодействует с субдоменом RED парного домена в Pax6 и высвобождает Pax6 из его сайта связывания с ДНК. Таким образом, сигнальный путь Smad/TGF-β выключает экспрессию Pax6, предотвращая его авторегуляцию собственного промотора [40].

Фактор транскрипции AP2α, или TFAP2α, представляет собой специфичный к определенной последова-

тельности ДНК-связывающий белок размером 52 кДа, который усиливает транскрипцию определенных генов путем связывания с GC-богатой последовательностью ДНК [7]. Этот транскрипционный фактор распознает палиндромную последовательность 5'-GCCNNNGGC-3'.

Хорошо изучена роль TFAP2 $\alpha$  в канцерогенезе, однако об экспрессии этого гена в ЦНС человека известно не так много. Исследования на других организмах продемонстрировали участие TFAP2 $\alpha$  в дифференцировке и/или индукции нервного гребня, а также в регуляции эпидермальных генов. Экспрессия TFAP2 $\alpha$  в эктодерме зависит от активации сигнальных путей Wnt/beta catenin и BMP, как и у MSX2, что было продемонстрировано исследованиями Хепорус [16]. Хотя первые результаты исследований сообщали о том, что эктопическая экспрессия TFAP2 $\alpha$  снижает уровень экспрессии Sox2 [17], последние эксперименты демонстрируют, что при прямом взаимодействии с Sox2 AP2 $\alpha$  действует как активатор, напрямую связываясь с промотором [14].

E2F3a и E2F3b антагонистически регулируют экспрессию SOX2 в нейрональных стволовых клетках. В клетках, где отсутствует E2F3b и E2f3a является доминантной формой, обнаружено, что E2f3a подавляет экспрессию Sox2 вместе с членом семейства pRb p107 за счет связывания с промотором, способствуя дифференцировке и сокращая число клеток-предшественников. Наоборот, в клетках, лишенных E2f3a, где преобладает E2f3b, было найдено, что E2f3b активирует экспрессию Sox2, привлекая РНК-полимеразу II к его промотору, что приводит к усилению пролиферации [12].

ТВХ6 — ген, кодирующий T-box 6 — один из факторов транскрипции семейства T-box; экспрессируется в примитивной полоске и пресомитной параксиальной мезодерме во время гастрюляции. ТВХ6 репрессирует Sox2 путем инактивации энхансера N1, который отвечает за активацию Sox2 в каудально простирающейся нервной пластинке. Этот процесс способствует ингибированию развития нервов, что необходимо для спецификации параксиальной мезодермы из аксиальных стволовых клеток [38].

Транскрипционный фактор NONO действует как ключевой регулятор транскрипции Sox2 посредством подавления активности промотора. Было показано, что этот контроль осуществляется за счет взаимодействия со спиральным доменом и C-концевой областью NONO [15].

Гормон щитовидной железы Т(3)/TR $\alpha$ 1 является репрессором Sox2 и, согласно [18], подавляя экспрессию Sox2 в нейрогенных зонах взрослого мозга, способствует дифференцировке нейрональных стволовых клеток — в частности, в сторону фенотипа мигрирующих нейробластов.

Предполагается, что другой транскрипционный фактор семейства SOX, Sox21, способен регулировать экспрессию группы SOXB1 в общем и гена Sox2, в частности, в развивающейся ЦНС. Однако сообщается о противоречивых результатах воздействия продукта данного гена: было показано, что Sox21 противодействует активации репортерной конструкции SOXB1 в клетках хрусталика цыпленка [41] и способствует дифференцировке нейронов в гиппокампе взрослых [22], но необходим для поддержания нейрональных предшественников, а также для индукции плюрипотентности и репрограммирования с помощью Sox2 [13].

Последние исследования демонстрируют, что сверхэкспрессия Sox21 расширяет домен нейрональных предшественников SoxB1 и ингибирует дифференцировку нейронов путем связывания и противодействия активности Ngn2, но в то же время сниженная экспрессия Sox21 также снижает образование нейронов и вызывает гибель клеток. Было сделано предположение о том, что, как и сам Sox2, Sox21 отвечает за несколько функций в процессе нейрогенеза и влияет на уровень экспрессии по-разному в зависимости от концентрации и условий. Пороговый уровень необходим для дифференцировки нейронов, в частности, для индукции и поддержания экспрессии Sox2. При этом более высокая концентрация Sox21 ингибирует нейрогенез, приводя к увеличению экспрессии SoxB1 и поддержанию популяции нейрональных предшественников [43]. Также сообщается, что Sox2 может быть ингибитором Sox21 [19], но механизм этого процесса пока остается неясным.

Крайне примечателен тот факт, что Sox2 способен к саморегуляции. В эмбриональных стволовых клетках этот процесс осуществляется комплексом Oct3/4-Sox2 [3], однако белок Oct3/4 не экспрессируется в головном мозге. Тем не менее аналогичные механизмы авторегуляции Sox2 обнаружены в нейрональных стволовых клетках. Образуя комплекс вместе с транскрипционными факторами семейства POU Brn1 или Brn2, белок Sox2 способен связываться с одной из двух ближайших к гену Sox2 энхансерных областей SRR2 и регулировать свою транскрипцию [25]. Это явление наблюдается в переднем мозге, но не наблюдается в спинном мозге [26].

### Общее обсуждение

В данном обзоре были рассмотрены основные транскрипционные факторы, регулирующие экспрессию гена Sox2. Некоторые из них отличаются необычными механизмами взаимодействия и требуют проведения дополнительных исследований. Так, хотя антагонистическое

взаимодействие между Sox2 и Msx2, образующее петлю отрицательной обратной связи на разных уровнях экспрессии, подтверждено и экспериментально, механизм данного процесса нуждается в более подробном изучении. В первую очередь, необходим анализ динамики этого процесса, того, как степень обратной связи влияет на экспрессию генов.

Эксперименты по экспрессии этих генов *in vivo* с количественными оценками образующихся мРНК и белковых продуктов могут выявить автоколебательный характер данного взаимодействия. Кроме того, тот факт, что промотор Sox2 содержит относительно большое число сайтов связывания с транскрипционным фактором Proux1, может означать, что сродство белка Proux1 к определенному сайту определяется внешними условиями. Выявление факторов, которые это определяют, позволит составить более полную картину влияния Proux1 на Sox2.

Исследования механизма взаимодействия Sox2 и Sox21 стоит продолжать, как минимум, в двух основных направлениях:

- количественное определение соотношения их продуктов, превышение или понижение которого приводит к активации или репрессии Sox2 соответственно;
- проверка способности Sox2 ингибировать экспрессию Sox21 на каком-либо этапе. Механизм саморегуляции Sox2 также представляет интерес для более детального изучения.

### Заключение

Крайне маловероятно, что выявленные на сегодняшний день транскрипционные факторы представляют собой исчерпывающий набор, способный регулировать экспрессию Sox2. Более того, пока что имеющаяся информация ставит много важных вопросов о динамике экспрессии данного гена. Однако критическая необходимость участия Sox2 во множестве процессов требует всей доступной информации о механизмах его регуляции — это позволило бы более точно описывать и моделировать нервную и другие зависимые от Sox2 системы. Поэтому необходимо продолжать поиск других возможных транскрипционных факторов и исследовать механизмы действия уже выявленных.

*Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт», тематический план 1.11. «Разработка технологических решений по созданию бионических имплантируемых сенсорных устройств и метаболических преобразователей энергии».*

### Литература

1. Васильева Т.А., Воскресенская А.А., Поздеева Н.А., Марахонов А.В., Зинченко Р.А. Характеристика гена PAX6 и роль его мутаций в развитии наследственной патологии органа зрения // Генетика. — 2018. — Т. 54. — № 9. — С. 979–987.
2. Archer T.C., Jin J., Casey E.S. Interaction of Sox1, Sox2, Sox3 and Oct4 during primary neurogenesis // Dev. Biol. — 2011. — Vol. 350(2). — P. 429–440.
3. Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F., Johnstone S.E., Levine S.S., Zucker J.P., Guenther M.G., Kumar R.M., Murray H.L., Jenner R.G., Gifford D.K., Melton D.A., Jaenisch R., Young R.A. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells // Cell. — 2005. — Vol. 122(6). — P. 947–956.
4. Brugger S.M., Merrill A.E., Torres-Vazquez J., et al. A phylogenetically conserved cis-regulatory module in the Msx2 promoter is sufficient for BMP-dependent transcription in murine and Drosophila embryos // Development. — 2004. — Vol. 131. — P. 5153–5165.
5. Dvorakova M., Macova I., Bohuslavova R., Anderova M., Fritsch B., Pavlinkova G. Early ear neuronal development, but not olfactory or lens development, can proceed without SOX2 // Dev. Biol. — 2020. — Vol. 457(1). — P. 43–56.
6. Ferri A.L., Cavallaro M., Braidia D., Di Cristofano A., Canta A., Vezzani A., Ottolenghi S., Pandolfi P.P., Sala M., DeBiasi S., Nicolis S.K. Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain // Development. — 2004. — Vol. 131(15). — P. 3805–3819.
7. García M.A., Campillos M., Ogueta S., Valdivieso F., Vázquez J. Identification of amino acid residues of transcription factor AP-2 involved in DNA binding // J. Mol. Biol. — 2000. — Vol. 301(4). — P. 807–816.
8. Gontan C., de Munck A., Vermeij M., Grosveld F., Tibboel D., Rottier R. Sox2 is important for two crucial processes in lung development: branching morphogenesis and epithelial cell differentiation // Dev. Biol. — 2008. — Vol. 317(1). — P. 296–309.
9. Gámez B., Rodríguez-Carballo E., Ventura F. BMP signaling in telencephalic neural cell specification and maturation // Front. Cell Neurosci. — 2013. — Vol. 7. — Art. 87. doi: 10.3389/fncel.2013.00087.
10. Hisato K., Masanori U., Yasuo I. Chapter 12 — Multiple Roles for SOX2 in Eye Development // Sox2, Academic Press. — 2016. — P. 217–233. doi: 10.1016/B978-0-12-800352-7.00012-8.
11. Ikushima H., Todo T., Ino Y., Takahashi M., Miyazawa K., Miyazono K. Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors // Cell Stem Cell. — 2009. — Vol. 5(5). — P. 504–514.
12. Julian L.M., Vandenbosch R., Pakenham C.A., Andrusiak M.G., Nguyen A.P., McClellan K.A., Svoboda D.S., Lagace

- D.C., Park D.S., Leone G., Blais A., Slack R.S.* Opposing regulation of Sox2 by cell-cycle effectors E2f3a and E2f3b in neural stem cells // *Cell Stem Cell*. – 2013. – Vol. 12(4). – P. 440–452.
13. *Kuzmichev A.N., Kim S.K., D'Alessio A.C., Chenoweth J.G., Wittko I.M., Campanati L., McKay R.D.* Sox2 acts through Sox21 to regulate transcription in pluripotent and differentiated cells // *Curr. Biol*. – 2012. – Vol. 22(18). – P. 1705–1710.
  14. *Lengler J., Bittner T., Münster D., Gawad Ael-D., Graw J.* Agonistic and antagonistic action of AP2, Msx2, Pax6, Prox1 AND Six3 in the regulation of Sox2 expression // *Ophthalmic Res*. – 2005. – Vol. 37(6). – P. 301–309.
  15. *Liang S., Takahashi H., Hirose T., Kuramitsu Y., Hatakeyama S., Yoshiyama H., Wang R., Hamada J.I., Iizasa H.* NONO is a negative regulator of SOX2 promoter // *Cancer Genomics Proteomics*. – 2020. – Vol. 17(4). – P. 359–367.
  16. *Luo T., Zhang Y., Khadka D., Rangarajan J., Cho K.W., Sargent T.D.* Regulatory targets for transcription factor AP2 in *Xenopus* embryos // *Dev. Growth Differ*. – 2005. – Vol. 47(6). – P. 403–413.
  17. *Luo T. et al.* Induction of neural crest in *Xenopus* by transcription factor AP2 $\alpha$  // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2003. – Vol. 100(2). – P. 532–537.
  18. *López-Juárez A., Remaud S., Hassani Z., Jolivet P., Pierre Simons J., Sontag T., Yoshikawa K., Price J., Morvan-Dubois G., Demeneix B.A.* Thyroid hormone signaling acts as a neurogenic switch by repressing Sox2 in the adult neural stem cell niche // *Cell Stem Cell*. – 2012. – Vol. 10(5). – P. 531–543.
  19. *Mallanna S.K., Ormsbee B.D., Iacovino M., Gilmore J.M., Cox J.L., Kyba M., Washburn M.P., Rizzino A.* Proteomic analysis of Sox2-associated proteins during early stages of mouse embryonic stem cell differentiation identifies Sox21 as a novel regulator of stem cell fate // *Stem Cells*. – 2010. – Vol. 28(10). – P. 1715–1727.
  20. *Mansouri S., Nejad R., Karabork M., Ekinci C., Solaroglu I., Aldape K.D., Zadeh G.* Sox2: regulation of expression and contribution to brain tumors // *CNS Oncol*. – 2016. – Vol. 5(3). – P. 159–173.
  21. *Marqués-Torrejón M.Á., Porlan E., Banito A., Gómez-Ibarlucea E., Lopez-Contreras A.J., Fernández-Capetillo O., Vidal A., Gil J., Torres J., Fariñas I.* Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 controls adult neural stem cell expansion by regulating Sox2 gene expression // *Cell Stem Cell*. – 2013. – Vol. 12(1). – P. 88–100.
  22. *Matsuda S., Kuwako K., Okano H.J., Tsutsumi S., Aburatani H., Saga Y., Matsuzaki Y., Akaike A., Sugimoto H., Okano H.* Sox21 promotes hippocampal adult neurogenesis via the transcriptional repression of the Hes5 gene // *J. Neurosci*. – 2012. – Vol. 32(36). – P. 12543–12557.
  23. *Mercurio S., Serra L., Nicolis S.K.* More than just stem cells: Functional roles of the transcription factor Sox2 in differentiated glia and neurons // *Int. J. Mol. Sci*. – 2019. – Vol. 20(18). – Art. 4540. doi: 10.3390/ijms20184540.
  24. *Mercurio S., Serra L., Pagin M., Nicolis S.K.* Deconstructing Sox2 function in brain development and disease // *Cells*. – 2022. – Vol. 11(10). – Art. 1604. doi: 10.3390/cells11101604.
  25. *Miyagi S., Saito T., Mizutani K., Masuyama N., Gotoh Y., Iwama A., Nakauchi H., Masui S., Niwa H., Nishimoto M., Muramatsu M., Okuda A.* The Sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct types of multipotent stem cells // *Mol. Cell Biol*. – 2004. – Vol. 24(10). – P. 4207–4220.
  26. *Miyagi S., Nishimoto M., Saito T., Ninomiya M., Sawamoto K., Okano H., Muramatsu M., Oguro H., Iwama A., Okuda A.* The Sox2 regulatory region 2 functions as a neural stem cell-specific enhancer in the telencephalon // *J. Biol. Chem*. – 2006. – Vol. 281(19). – P. 13374–13381.
  27. *Novak D., Hüser L., Elton J.J., Umansky V., Altevogt P., Utikal J.* SOX2 in development and cancer biology // *Semin. Cancer Biol*. – 2020. – Vol. 67(Pt. 1). – P. 74–82.
  28. *Okubo T., Pevny L.H., Hogan B.L.* Sox2 is required for development of taste bud sensory cells // *Genes Dev*. – 2006. – Vol. 20(19). – P. 2654–2659.
  29. *She Z.Y., Yang W.X.* SOX family transcription factors involved in diverse cellular events during development // *Eur. J. Cell Biol*. – 2015. – Vol. 94(12). – P. 547–563.
  30. *Shukla S., Mishra R.* Autoregulation of Pax6 in neuronal cells is mediated by Pax6(5a), Pax6( $\Delta$ PD), SPARC, and p53 // *Mol. Biol. Rep*. – 2022. – Vol. 49. – P. 3271–3279.
  31. *Steevens A.R., Glatzer J.C., Kellogg C.C., Low W.C., Santi P.A., Kiernan A.E.* SOX2 is required for inner ear growth and cochlear nonsensory formation before sensory development // *Development*. – 2019. – Vol. 146(13). – dev170522. doi: 10.1242/dev.170522.
  32. *Stergiopoulos A., Elkouris M., Politis P.K.* Prospero-related homeobox 1 (Prox1) at the crossroads of diverse pathways during adult neural fate specification // *Front. Cell Neurosci*. – 2015. – Vol. 8. – Art. 454. doi: 10.3389/fncel.2014.00454.
  33. *Stevanovic M., Drakulic D., Lazic A., Ninkovic D.S., Schwirtlich M., Mojsin M.* SOX Transcription factors as important regulators of neuronal and glial differentiation during nervous system development and adult neurogenesis // *Front. Mol. Neurosci*. – 2021. – Vol. 14. – Art. 654031. doi: 10.3389/fnmol.2021.654031.
  34. *Stevanovic M., Zuffardi O., Collignon J., Lovell-Badge R., Goodfellow P.* The cDNA sequence and chromosomal location of the human SOX2 gene // *Mamm. Genome*. – 1994. – Vol. 5(10). – P. 640–642.
  35. *Sun J., Ishii M., Ting M.C., Maxson R.* Foxc1 controls the growth of the murine frontal bone rudiment by direct regulation of a Bmp response threshold of Msx2 // *Development*. – 2013. – Vol. 140. – P. 1034–1044.

36. Sutus E., Henry S., Adorján L. et al. RYBP regulates Pax6 during in vitro neural differentiation of mouse embryonic stem cells // *Sci. Rep.* — 2022. — Vol. 12(1). — Art. 2364. doi: 10.1038/s41598-022-06228-1.
37. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell.* — 2006. — Vol. 126(4). — P. 663–676.
38. Takemoto T., Uchikawa M., Yoshida M. et al. Tbx6-dependent Sox2 regulation determines neural or mesodermal fate in axial stem cells // *Nature.* — 2011. — Vol. 470. — P. 394–398.
39. Thakurela S., Tiwari N., Schick S. et al. Mapping gene regulatory circuitry of Pax6 during neurogenesis // *Cell Discov.* — 2016. — Vol. 2. — Art. 15045. doi: 10.1038/celldisc.2015.45.
40. Tripathi R., Mishra R. Interaction of Pax6 with SPARC and p53 in brain of mice indicates Smad3 dependent auto-regulation // *J. Mol. Neurosci.* — 2010. — Vol. 41. — P. 397–403.
41. Uchikawa M., Kamachi Y., Kondoh H. Two distinct subgroups of Group B Sox genes for transcriptional activators and repressors: their expression during embryonic organogenesis of the chicken // *Mech. Dev.* — 1999. — Vol. 84(1–2). — P. 103–120.
42. Wen J., Hu Q., Li M., Wang S., Zhang L., Chen Y., Li L. Pax6 directly modulate Sox2 expression in the neural progenitor cells // *Neuroreport.* — 2008. — Vol. 19(4). — P. 413–417.
43. Whittington N., Cunningham D., Le T.K., De Maria D., Silva E.M. Sox21 regulates the progression of neuronal differentiation in a dose-dependent manner // *Developmental Biology.* — 2015. — Vol. 397(2). — P. 237–247.
44. Wu Q., Zhang L., Su P., Lei X., Liu X., Wang H., Lu L., Bai Y., Xiong T., Li D., Zhu Z., Duan E., Jiang E., Feng S., Han M., et al. MSX2 mediates entry of human pluripotent stem cells into mesendoderm by simultaneously suppressing SOX2 and activating NODAL signaling // *Cell Res.* — 2015. — Vol. 25. — P. 1314–1332.
45. Zhang S., Cui W. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation // *World J. Stem Cells.* — 2014. — Vol. 6(3). — P. 305–311.
4. Brugger SM, Merrill AE, Torres-Vazquez J, et al. A phylogenetically conserved cis-regulatory module in the Msx2 promoter is sufficient for BMP-dependent transcription in murine and Drosophila embryos. *Development* 2004; 131:5153–5165.
5. Dvorakova M, Macova I, Bohuslavova R, Anderova M, Fritzscht B, Pavlinkova G. Early ear neuronal development, but not olfactory or lens development, can proceed without SOX2. *Dev Biol* 2020; 457(1):43–56.
6. Ferri AL, Cavallaro M, Braidà D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, Ottolenghi S, Pandolfi PP, Sala M, DeBiasi S, Nicolis SK. Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* 2004; 131(15):3805–3819.
7. García MA, Campillos M, Ogueta S, Valdivieso F, Vázquez J. Identification of amino acid residues of transcription factor AP-2 involved in DNA binding. *J Mol Biol* 2000; 301(4):807–816.
8. Gontan C, de Munck A, Vermeij M, Grosveld F, Tibboel D, Rottier R. Sox2 is important for two crucial processes in lung development: branching morphogenesis and epithelial cell differentiation. *Dev Biol* 2008; 317(1):296–309.
9. Gámez B, Rodríguez-Carballo E, Ventura F. BMP signaling in telencephalic neural cell specification and maturation. *Front. Cell Neurosci* 2013; 7:87. doi: 10.3389/fncel.2013.00087.
10. Hisato K, Masanori U, Yasuo I. Chapter 12 — Multiple Roles for SOX2 in Eye Development. *Sox2*, Academic Press 2016:217–233. doi: 10.1016/B978-0-12-800352-7.00012-8.
11. Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Miyazawa K, Miyazono K. Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell* 2009; 5(5):504–514.
12. Julian LM, Vandenbosch R, Pakenham CA, Andrusiak MG, Nguyen AP, McClellan KA, Svoboda DS, Lagace DC, Park DS, Leone G, Blais A, Slack RS. Opposing regulation of Sox2 by cell-cycle effectors E2f3a and E2f3b in neural stem cells. *Cell Stem Cell* 2013; 12(4):440–452.
13. Kuzmichev AN, Kim SK, D'Alessio AC, Chenoweth JG, Wittko IM, Campanati L, McKay RD. Sox2 acts through Sox21 to regulate transcription in pluripotent and differentiated cells. *Curr Biol* 2012; 22(18):1705–1710.
14. Lengler J, Bittner T, Münster D, Gawad Ael-D, Graw J. Agonistic and antagonistic action of AP2, Msx2, Pax6, Prox1 AND Six3 in the regulation of Sox2 expression. *Ophthalmic Res* 2005; 37(6):301–309.
15. Liang S, Takahashi H, Hirose T, Kuramitsu Y, Hatakeyama S, Yoshiyama H, Wang R, Hamada JI, Iizasa H. NONO is a negative regulator of SOX2 promoter. *Cancer Genomics Proteomics* 2020; 17(4):359–367.
16. Luo T, Zhang Y, Khadka D, Rangarajan J, Cho KW, Sargent TD. Regulatory targets for transcription factor AP2 in Xenopus embryos. *Dev Growth Differ* 2005; 47(6):403–413.
17. Luo T et al. Induction of neural crest in Xenopus by transcription factor AP2α. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2003; 100(2):532–537.

## References

1. Vasil'yeva TA, Voskresenskaya AA, Pozdeyeva NA, Marakhonov AV, Zinchenko RA. Kharakteristika gena RAKH6 i rol' yego mutatsiy v razvitiy nasledstvennoy patologii organa zreniya. *Genetika* 2018; 54(9):979–987 (in Russian).
2. Archer TC, Jin J, Casey ES. Interaction of Sox1, Sox2, Sox3 and Oct4 during primary neurogenesis. *Dev Biol* 2011; 350(2):429–440.
3. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122(6):947–956.

18. López-Juárez A, Remaud S, Hassani Z, Jolivet P, Pierre Simons J, Sontag T, Yoshikawa K, Price J, Morvan-Dubois G, Demeneix BA. Thyroid hormone signaling acts as a neurogenic switch by repressing Sox2 in the adult neural stem cell niche. *Cell Stem Cell* 2012; 10(5):531–543.
19. Mallanna SK, Ormsbee BD, Iacovino M, Gilmore JM, Cox JL, Kyba M, Washburn MP, Rizzino A. Proteomic analysis of Sox2-associated proteins during early stages of mouse embryonic stem cell differentiation identifies Sox21 as a novel regulator of stem cell fate. *Stem Cells* 2010; 28(10):1715–1727.
20. Mansouri S, Nejad R, Karabork M, Ekinci C, Solaroglu I, Aldape KD, Zadeh G. Sox2: regulation of expression and contribution to brain tumors. *CNS Oncol* 2016; 5(3):159–173.
21. Marqués-Torrejón MÁ, Porlan E, Banito A, Gómez-Ibarlucea E, Lopez-Contreras AJ, Fernández-Capetillo O, Vidal A, Gil J, Torres J, Fariñas I. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 controls adult neural stem cell expansion by regulating Sox2 gene expression. *Cell Stem Cell* 2013; 12(1):88–100.
22. Matsuda S, Kuwako K, Okano HJ, Tsutsumi S, Aburatani H, Saga Y, Matsuzaki Y, Akaike A, Sugimoto H, Okano H. Sox21 promotes hippocampal adult neurogenesis via the transcriptional repression of the Hes5 gene. *J Neurosci* 2012; 32(36):12543–12557.
23. Mercurio S, Serra L, Nicolis SK. More than just stem cells: Functional roles of the transcription factor Sox2 in differentiated glia and neurons. *Int J Mol Sci* 2019; 20(18):4540. doi: 10.3390/ijms20184540.
24. Mercurio S, Serra L, Pagin M, Nicolis SK. Deconstructing Sox2 function in brain development and disease. *Cells* 2022; 11(10):1604. doi: 10.3390/cells11101604.
25. Miyagi S, Saito T, Mizutani K, Masuyama N, Gotoh Y, Iwama A, Nakauchi H, Masui S, Niwa H, Nishimoto M, Muramatsu M, Okuda A. The Sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct types of multipotent stem cells. *Mol Cell Biol* 2004; 24(10):4207–4220.
26. Miyagi S, Nishimoto M, Saito T, Ninomiya M, Sawamoto K, Okano H, Muramatsu M, Oguro H, Iwama A, Okuda A. The Sox2 regulatory region 2 functions as a neural stem cell-specific enhancer in the telencephalon. *J Biol Chem* 2006; 281(19):13374–13381.
27. Novak D, Hüser L, Elton JJ, Umansky V, Altevogt P, Utikal J. SOX2 in development and cancer biology. *Semin Cancer Biol* 2020; 67(Pt 1):74–82.
28. Okubo T, Pevny LH, Hogan BL. Sox2 is required for development of taste bud sensory cells. *Genes Dev* 2006; 20(19):2654–2659.
29. She ZY, Yang WX. SOX family transcription factors involved in diverse cellular events during development. *Eur J Cell Biol* 2015; 94(12):547–563.
30. Shukla S, Mishra R. Autoregulation of Pax6 in neuronal cells is mediated by Pax6(5a), Pax6( $\Delta$ PD), SPARC, and p53. *Mol Biol Rep* 2022; 49:3271–3279.
31. Steevens AR, Glatzer JC, Kellogg CC, Low WC, Santi PA, Kiernan AE. SOX2 is required for inner ear growth and cochlear nonsensory formation before sensory development. *Development* 2019; 146(13):dev170522. doi: 10.1242/dev.170522.
32. Stergiopoulos A, Elkouris M, Politis PK. Prospero-related homeobox 1 (Prox1) at the crossroads of diverse pathways during adult neural fate specification. *Front Cell Neurosci* 2015; 8:454. doi: 10.3389/fncel.2014.00454.
33. Stevanovic M, Drakulic D, Lazic A, Ninkovic DS, Schwirtlich M, Mojsin M. SOX Transcription factors as important regulators of neuronal and glial differentiation during nervous system development and adult neurogenesis. *Front Mol Neurosci* 2021; 14:654031. doi: 10.3389/fnmol.2021.654031.
34. Stevanovic M, Zuffardi O, Collignon J, Lovell-Badge R, Goodfellow P. The cDNA sequence and chromosomal location of the human SOX2 gene. *Mamm Genome* 1994; 5(10):640–642.
35. Sun J, Ishii M, Ting MC, Maxson R. Foxc1 controls the growth of the murine frontal bone rudiment by direct regulation of a Bmp response threshold of Msx2. *Development* 2013; 140:1034–1044.
36. Sutus E, Henry S, Adorján L et al. RYBP regulates Pax6 during in vitro neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Sci Rep* 2022; 12(1):2364. doi: 10.1038/s41598-022-06228-1.
37. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4):663–676.
38. Takemoto T, Uchikawa M, Yoshida M et al. Tbx6-dependent Sox2 regulation determines neural or mesodermal fate in axial stem cells. *Nature* 2011; 470:394–398.
39. Thakurela S, Tiwari N, Schick S et al. Mapping gene regulatory circuitry of Pax6 during neurogenesis. *Cell Discov* 2016; 2:15045. doi: 10.1038/celldisc.2015.45.
40. Tripathi R, Mishra R. Interaction of Pax6 with SPARC and p53 in brain of mice indicates Smad3 dependent auto-regulation. *J Mol Neurosci* 2010; 41:397–403.
41. Uchikawa M, Kamachi Y, Kondoh H. Two distinct subgroups of Group B Sox genes for transcriptional activators and repressors: their expression during embryonic organogenesis of the chicken. *Mech Dev* 1999; 84(1–2):103–120.
42. Wen J, Hu Q, Li M, Wang S, Zhang L, Chen Y, Li L. Pax6 directly modulate Sox2 expression in the neural progenitor cells. *Neuroreport* 2008; 19(4):413–417.
43. Whittington N, Cunningham D, Le TK, De Maria D, Silva EM. Sox21 regulates the progression of neuronal differentiation in a dose-dependent manner. *Developmental Biology* 2015; 397(2):237–247.
44. Wu Q, Zhang L, Su P, Lei X, Liu X, Wang H, Lu L, Bai Y, Xiong T, Li D, Zhu Z, Duan E, Jiang E, Feng S, Han M, et al. MSX2 mediates entry of human pluripotent stem cells into mesendoderm by simultaneously suppressing SOX2 and activating NODAL signaling. *Cell Res* 2015; 25:1314–1332.
45. Zhang S, Cui W. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells* 2014; 6(3):305–311.

## REGULATION OF SOX2 EXPRESSION BY TRANSCRIPTION FACTORS IN NEURONAL STEM CELLS

E.V. LAPTENKOVA<sup>1,2</sup>, P.M. GOTOVTSEV<sup>1,2</sup>, R.G. VASILOV<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *The National Research Centre Kurchatov Institute, Department of Biotechnology and Bioenergy,*

<sup>2</sup> *Moscow Institute of Physics and Technology*

Sox2 is a transcription factor critical for mammalian development and plays a significant role in a wide variety of biological processes. In the nervous system, Sox2 supports the self-renewal of neuronal stem cells, which is essential for both prenatal development and adult neurogenesis. At the same time, its effect is dose-dependent and requires fine regulation. This review collects information on the results and mechanisms of action of key transcription factors on Sox2 expression in neuronal stem cells and suggests possible directions for further research.

*Keywords:* Sox2, regulation, transcription factors, neuronal stem cells, neuronal differentiation, reviews.

### **Address:**

Gotovtsev P.M., Ph.D.

National Research Centre «Kurchatov Institute»

E-mail: gotovtsevpm@gmail.com

### **Для цитирования:**

Лаптенкова Е.В., Готовцев П.М., Василев Р.Г. Регуляция экспрессии гена Sox2 транскрипционными факторами в нейрональных стволовых клетках. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(4):39–47.

### **For citation:**

E.V. Laptenkova, P.M. Gotovtsev, Vasilov R.G. Regulation of Sox2 expression by transcription factors in neuronal stem cells. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(4):39–47 (in Russian).

# БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ ДЛЯ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В БИОМЕДИЦИНЕ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

В.М. ЧЕРНОВ, А.А. МУЗЫКАНТОВ\*, Н.Б. БАРАНОВА, О.А. ЧЕРНОВА

*Казанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН», Казань*

Бактериальные внеклеточные везикулы (бВВ) — окруженные липидной мембраной наноструктуры, наполненные компонентами бактериального происхождения. Они играют важную роль в физиологии и патогенезе бактерий, в процессах взаимодействия между клетками бактерий, а также между клетками бактерий и эукариот. Успехи в биотехнологии за последние годы определили возможность модифицирования поверхности бВВ, «декорирования» ее разнообразными биомолекулами и наночастицами для модуляции их функций. Сегодня бВВ находятся в центре внимания исследователей широкого спектра биомедицинских направлений как перспективные вакцины, иммунотерапевтические препараты для лечения инфекционных и онкологических заболеваний, а также диагностические маркеры и средства доставки лекарственных препаратов. Для полного раскрытия клинического потенциала и трансзиции бВВ в практическую медицину необходимо решить вопросы, связанные с их безопасностью и производственным процессом. Обзор посвящен анализу успехов и проблем применения бВВ в биомедицине и обсуждению возможных путей клинической трансляции новых технологий, основанных на бВВ.

*Ключевые слова:* биомедицина, новые технологии, бактериальные внеклеточные везикулы, обзоры.

## Общие сведения о бВВ

Внеклеточные везикулы (ВВ) — секретируемые клетками сферические, окруженные протеолипидным бислоем наноструктуры, которые содержат различные наборы биомолекул исходных (родительских) бактерий. Клетки бактерий, как и клетки эукариот и архей, секретируют во внешнюю среду ВВ. Появление методов высокого разрешения позволило выявить у бактерий несколько категорий везикул, отражающих разные пути их формирования и функции [7]. Категории бВВ, у которых обнаружены функции, связанные со специфичным трафиком и межклеточной коммуникацией, находятся в фокусе особого внимания у исследователей фундаментальной и прикладной биологии и медицины [46]. К соответствующим категориям относят везикулы, секретируемые клетками бесстеночных бактерий (Mollicutes), ассоциированных с

мельчайшими способными к самостоятельному воспроизведению прокариотами, — EVs (**E**xtracellular **V**esicles), а также классических грамотрицательных и грамположительных бактерий — OMVs (**O**uter **M**embrane **V**esicles) и CMVs (**C**ytoplasmic **M**embrane **V**esicles) соответственно. ВВ грамотрицательных бактерий, OMVs, называемые везикулами внешней мембраны, образуются из внешней мембраны бактерий, — они несут и периплазматические и цитоплазматические компоненты, и имеют диаметр 20–250 нм. ВВ грамположительных бактерий, CMVs, известные как цитоплазматические мембранные везикулы, образуются из цитоплазматической мембраны, — они содержат молекулы цитозоля и имеют размер 20–400 нм. Особый класс представляют везикулы, продуцируемые клетками бактерий, не имеющих клеточной стенки — EVs. Они ограничены только цитоплазматической мембраной, содержат как мембранные, так и цитоплазматические компоненты и имеют диаметр 30–220 нм. На рисунке 1 отражены принципиальные различия соответствующих наноструктур.

Везикулы одного и того же бактериального изолята могут существенно различаться по размеру и составу. Технологии для анализа карго каждой отдельной везикулы пока отсутствуют [16], что существенно затрудняет оценку гетерогенности везикулярных субпопуляций и выяснение их функций.

© 2022 г. Чернов В.М., Музыкантов А.А., Баранова Н.Б., Чернова О.А.

\* Автор для переписки:

Музыкантов Алексей Александрович

канд. биол. наук, старший научный сотрудник, Казанский институт биохимии и биофизики — обособленное структурное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН»

E-mail: muzaleksei@mail.ru

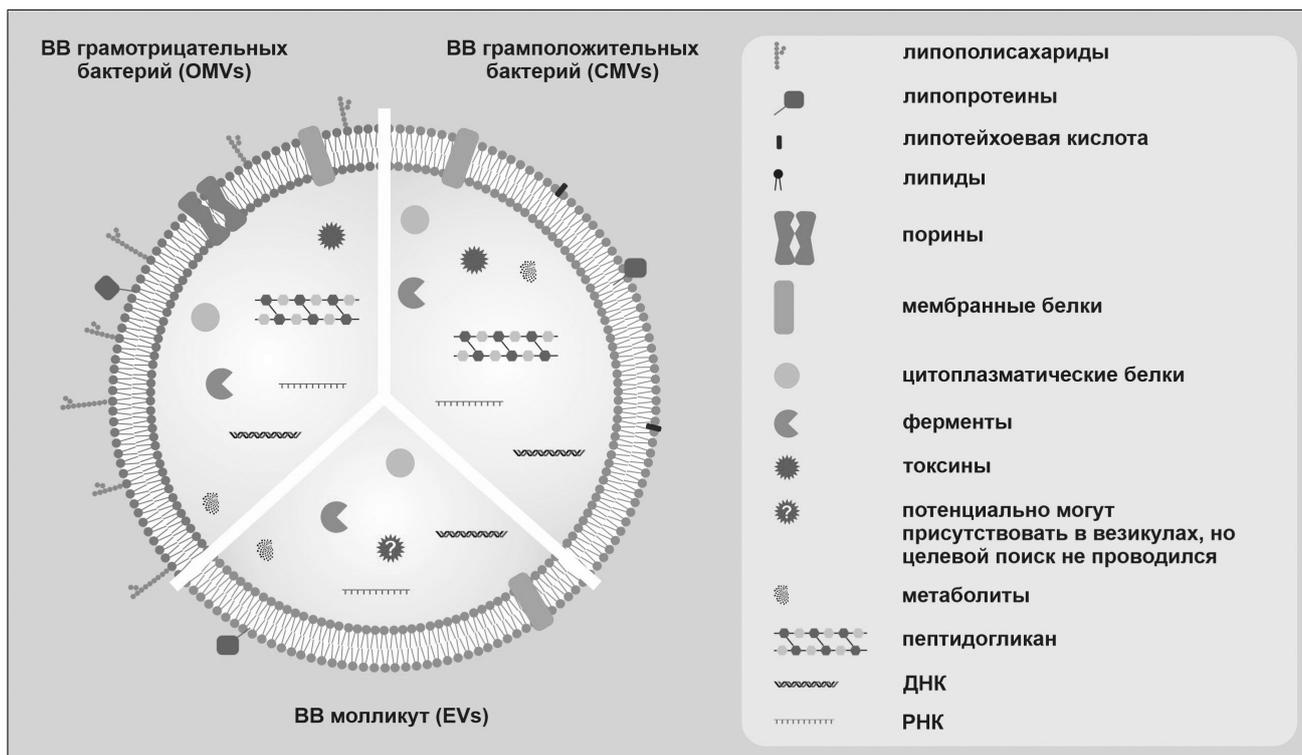


Рис. 1. Структура и состав внеклеточных везикул, продуцируемых грамотрицательными и грамположительными бактериями, а также молликутами

Механизмы образования бВВ пока плохо поняты. В случае CMVs механизмы биогенеза могут быть связаны с действием ферментов, повреждающих пептидогликан [6]. В случае микоплазм возможный путь образования ВВ связывают с мембранным почкованием. Формированию OMVs способствуют процессы, связанные с:

1. Разрушением пептидогликан-липопротеиновых связей пептидогликановыми эндопротеазами и/или другими ферментами, вовлеченными в регуляцию синтеза/гидролиза пептидогликана.
2. Более быстрым ростом внешней мембраны относительно мембранного слоя, расположенного под ней.
3. Тургорным давлением, индуцированным накоплением липополисахаридов, фрагментов пептидогликана.
4. Выпячиванием наружу зон внешней мембраны, обогащенных липополисахаридами, фосфолипидами и/или специфичными молекулами, ассоциированными с липополисахаридами, из-за их атипичных структур или зарядов [3].

Вопросы о том, как различаются поверхностные маркеры и внутренний состав бВВ в зависимости от способов их биогенеза и каковы механизмы сортировки, ждут решения.

бВВ способны оказывать большое влияние на реципиентные клетки, в том числе на клетки высших

эукариот: они могут оперативно их репрограммировать — модифицировать их фенотип и функции. Так, высвободившись из бактериальной клетки во внеклеточное пространство, бВВ могут активировать внутриклеточный сигнальный путь клетки-мишени через лиганд-рецепторные взаимодействия и/или интернализироваться посредством эндоцитоза, фагоцитоза, макропиноцитоза или мембранного слияния [29]. При этом бВВ, происходящие из клеток одного и того же штамма бактерии, но секретированные в разное время роста культуры и/или разных условиях среды, могут иметь различный состав и, соответственно, проявлять разные эффекты в отношении клеток-мишеней [35]. После интернализации бВВ высвобождают свое содержимое в цитоплазму клетки и, в зависимости от его состава, модулируют поведение клетки, — индуцируют подавление или активацию иммунного ответа. Например, OMVs *Salmonella enterica* подавляют иммунный ответ, тогда как OMVs *Escherichia coli* — напротив, индуцируют иммуноактивацию (вызывают провоспалительный ответ) в отношении эпителиальных клеток почек (HEK293A) и макрофагов костного мозга (BMDM) соответственно [26, 40]. бВВ *H. pylori* вызывают подавление иммунного ответа в отношении клеток аденокарциномы желудка человека, с чем и связывают возможность персистенции этой

бактерии [50]. Уникальный ответ был обнаружен у эукариотических клеток на бВВ молликут. Оказалось, что проникновение ВВ *Acholeplasma laidlawii* (убиквитарная микоплазма, инфицирующая высших эукариот, являющаяся основным контаминантом клеточных культур и вакцинных препаратов) в фибробласты кожи человека *in vitro*, не приводит к значимым изменениям иммунореактивности, ассоциированной с профилем секреции ключевых про- и противовоспалительных цитокинов, но сопровождается существенным изменением клеточного протеома [1]. В пуле дифференциально экспрессированных регистрируются белки, участвующие в фолдинге, формировании цитоскелета, биогенезе микровезикул и пролиферации клеток.

Полученные к настоящему времени экспериментальные данные указывают на то, что роль бВВ микроорганизмов и микробных сообществ, в том числе кишечной микробиоты, в нормальной физиологии и патологических процессах у высших организмов может быть весьма существенной. Природный потенциал воздействия бВВ и возможность инжиниринга поверхности бВВ делает эти наноструктуры притягательными для использования в разных областях, прежде всего в медицине. Неудивительно, что в настоящее время наблюдается стремительный рост количества преclinical испытаний [37, 46], связанных с применением бВВ в качестве диагностикумов, лекарств для лечения инфекционных и онкологических заболеваний, средств лекарственной доставки, наконец, вакцин нового типа (рис. 2).



Рис. 2. Схема основных направлений практического приложения бВВ построена согласно данным [37, 46], с дополнениями и изменениями

В 1987 году первая, основанная на OMVs вакцина против *Neisseria meningitidis serogroup B* (MenB), была разрешена для применения на Кубе и впоследствии одобрена в Норвегии и Новой Зеландии [36]. В 2013 году мультикомпонентная вакцина, основанная на OMVs *Neisseria meningitidis serogroup B*, также была одобрена Европейским Медицинским агентством (EMA) и основным регулятором использования лекарственных препаратов США — FDA [27]. Однако, несмотря на несомненные успехи такого практического приложения бВВ, для крупномасштабного перехода в клинику технологий, основанных на бВВ, потребуется преодолеть значительные препятствия, связанные с получением и безопасностью этих наноструктур. В предлагаемом обзоре обсуждаются проблемы и перспективы решения этих вопросов.

### **Препаративное выделение бВВ: проблемы и возможность их решения**

*Гетерогенность бВВ.* Популяция бВВ, выделенных из аксеничной бактериальной культуры, гетерогенна как по размеру, так и по составу содержимого везикул [12]. Высокая степень гетерогенности бВВ может быть следствием не только различных путей их биогенеза, но и действия внешних факторов — условий роста, особенностей состава среды, а также стадии роста культуры и т.д. Такие данные были получены, например, в отношении *H. pylori* и *A. laidlawii* [28, 48]. При этом везикулярный профиль факторов вирулентности, а также токсигенность ВВ, продуцируемых клетками бактерии в разных условиях, могут существенно различаться [31].

Гетерогенность везикул представляется весьма важным аспектом с точки зрения практического приложения бВВ — классы везикул могут иметь разное содержимое и, соответственно, таргетировать разные клетки хозяина, вызывать разные биологические эффекты [2, 12]. Вопрос о том, сколько вообще субпопуляций бВВ в аксеничной культуре в определенной точке роста в конкретных условиях среды и как они отличаются по функциям и свойствам, пока не решен ни для одного вида бактерий. Очевидно, что развитие практических приложений бВВ определяет необходимость детального исследования вопроса гетерогенности бВВ. Для этого необходимы высокочувствительные технологии, позволяющие анализировать разные субпопуляции бВВ. В этой связи уникальные микро- и нанотехнологии, открывшие возможность детекции и анализа единственных клеток и наночастиц в исследуемых образцах, могут оказаться весьма полезными для исследований гетерогенности популяций бВВ

[43]. Специфичные антитела, безусловно, могут быть эффективными для сепарации субпопуляций бВВ, но поиск специфичных антигенов бВВ у разных бактерий — отдельная область исследований, в которой делаются только первые шаги.

*Выделение и очистка бВВ.* Высокоэффективное выделение бВВ и очистка их от матрикса — основополагающий элемент исследований, определяющий возможность корректной характеристики соответствующих наноструктур, в том числе их биологических функций и токсигенного потенциала. Понятно, что клиническое применение бВВ требует особо высокого уровня очистки бВВ. Для этого предложены технические варианты [12, 46], которые включают в себя ультрацентрифугирование (УС), ультрафильтрацию (UF), преципитацию и эксклюзионную хроматографию (SEC), а также аффинное выделение и центрифугирование в градиенте плотности (DGC). Все известные варианты выделения бВВ из бактериальных культур имеют как сильные, так и слабые стороны (рис. 3). При этом, если культуральная среда имеет небольшое количество контаминантов, близких по плотности и размерам бВВ (например, небактериальные ВВ и липопroteины), предлагаемые подходы оказываются приемлемыми. Однако в сложных системах, таких как биологические жидкости или многокомпонентные среды, содержащие сыворотку, необходимо использовать комбинацию разных методов для эффективного удаления контаминантов.

Как известно, для выращивания некоторых бактерий — например, *N. meningitidis*, *H. pylori*, *M. tuberculosis* или представителей класса Mollicutes, требуются сложные питательные среды, содержащие сыворотку крови [10, 31]. В таких случаях возникает необходимость удаления из среды нецелевых ВВ (прежде всего эукариотических) или использования бессывороточных сред. В первом варианте можно использовать коммерческие сыворотки крови (для которых уже проведена процедура истощения экзосом по запатентованным технологиям) или самостоятельно удалять везикулы, например, с помощью ультрацентрифугирования и фильтрации [24]. Однако самостоятельное удаление нецелевых везикул из среды — трудоемкая и дорогостоящая процедура, что делает ее едва ли приемлемой для использования в производственных масштабах. Даже в случае выполнения рекомендуемых манипуляций часто не удается полностью освободиться от везикул сыворотки (в коммерческой сыворотке удаляется  $\geq 90\%$  экзосом), а степень очистки бВВ от небактериальных ВВ зависит от используемого

метода и/или коммерческих реагентов. Использование же бессывороточных сред для выращивания бактерий порождает новые проблемы. Культивирование указанных бактерий на бессывороточных средах приводит к существенным изменениям их физиологии, вирулентности [22, 30], а также изменению состава секретируемых

ими везикул. В этой связи оптимизация и разработка стандартизированных методов выделения и очистки бВВ, а также установление маркеров контроля качества очистки сегодня являются весьма актуальными как для фундаментальных исследований, так и практических приложений.

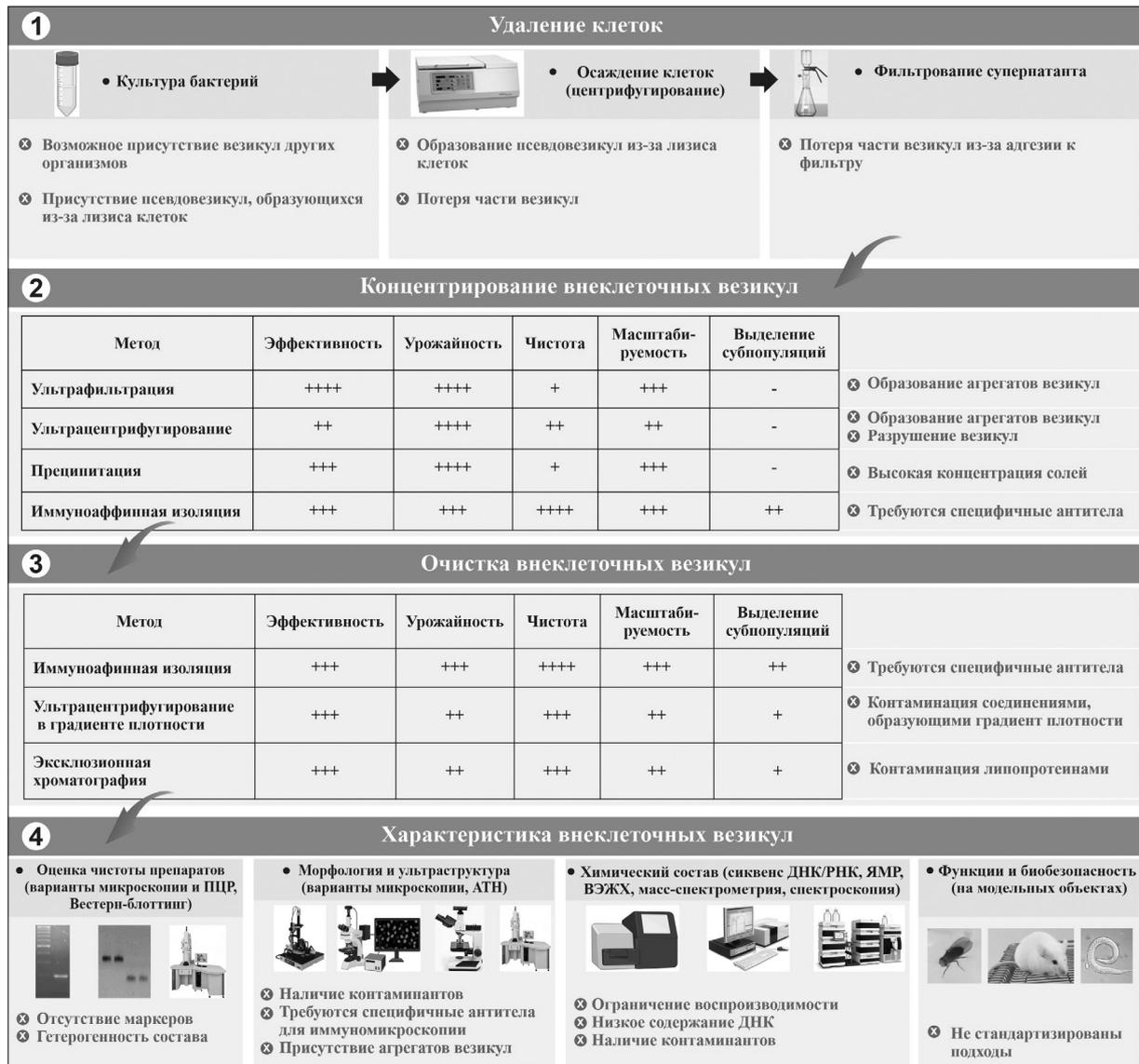


Рис. 3. Основные проблемы при выделении и исследовании внеклеточных везикул бактерий. Основные этапы выделения и анализа бВВ и связанные с ними проблемы. Цифрами (1–4) обозначены этапы, а ⊗ — проблемы.

АТН — анализ треков наночастиц; ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ЯМР — ядерный магнитный резонанс.

Пока используется единственный имеющийся метод очистки бВВ от небактериальных везикул в биожидкостях. Он основан на комбинации UC, SEC и DGC [12] и требует немало времени (около 23 часов); в конечном препарате бВВ при этом может присутствовать йодиксанол, что затрудняет использование этого способа для фундаментальных исследований бВВ или клинического применения. Аффинный путь выделения

бВВ, использующий для специфичного связывания везикул антитела или аптамеры, в принципе, мог бы стать быстрым методом получения высокоочищенных препаратов бактериальных везикул из сложных сред. Однако, как уже отмечалось, поиск специфичных молекул, связывающихся с бВВ, — почти не тронутое поле исследований. В этой связи остается надеяться на появление принципиально новых подходов, которые бы дали

простую и эффективную технологию выделения и очистки бВВ. Пока такие технологии отсутствуют, клинический переход бВВ вряд ли возможен.

**бВВ — новые вакцины, терапевтические средства и диагностические инструменты: проблемы и пути их решения**

*бВВ как вакцинные препараты.* бВВ «наследуют» от исходных (родительских) бактерий патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (РАМРs), включая антигены, и, соответственно, могут индуцировать иммунный ответ против патогенов [3, 6]. Это свойство бВВ способствовало появлению идеи использования везикул в качестве вакцин. Как уже отмечалось, на клиническом уровне первая вакцина против MenB, основанная на ОМVs *N. meningitidis*, была лицензирована в 1987 году для применения на Кубе, а позднее вакцины, основанные на ВВ этой бактерии, получили широкое распространение в мире [27]. Этот успех вдохновил исследователей — в последние годы интенсивные разработки связаны с вакцинным потенциалом бВВ. Высокую эффективность в исследованиях преклинического уровня показали основанные на бВВ вакцины против *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Salmonella typhimurium* и *Mycobacterium tuberculosis*. Они продемонстрировали выраженную способность индуцировать гуморальный и клеточный иммунитет [27] — эффект оказался сравним с таковым клеток соответствующих бактерий [5].

бВВ являются хорошим источником как специфичных, так и неспецифичных бактериальных антигенов. Кроме того, молекулы, ассоциированные с РАМРs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) на поверхности везикул, взаимодействуют с антиген-презентирующими клетками, и бВВ могут фагоцитироваться соответствующими клетками. Эти особенности открывают возможности использования бВВ в качестве адъювантов. Однако адъювантная способность бВВ является бактерия-специфичной [32], и поиск пути преодоления этой специфичности, а также снижения потенциальной токсичности бВВ представляется актуальным для клинического внедрения этих наноструктур.

Размер, форма и состав бВВ могут оказывать значительное влияние на способы их интернализации, презентацию антигена (АГ) и активацию иммунитета [4, 39]. В этой связи решение вопроса препаративного выделения субпопуляций бВВ весьма важно с точки зрения вакцинного приложения везикул. Для решения этого вопроса разрабатываются разные платформы, включая модификацию бВВ [44]. Успех инжиниринга бВВ, использованных в качестве вакцин против шигелл, сальмонелл и некоторых

других бактерий, показал реальность такого решения проблемы специфичности и токсичности бВВ. Возможность покрытия или наполнения везикул наночастицами открывают перспективы решения проблемы гетерогенности бВВ — это было продемонстрировано на примере *K. pneumoniae* [44]. Однако в таком случае становится очевидной необходимость поиска универсальных наночастиц, которые не оказывали бы влияние на иммунореактивность бВВ. Покрытие и загрузка бВВ определенными наночастицами способствуют усилению иммунного ответа на везикулярную вакцину, но разные типы наночастиц могут оказывать дополнительное, в том числе нежелательное, влияние на иммунореактивность. Это, в свою очередь, диктует необходимость поиска оптимальных наночастиц. Для решения проблемы предлагается получать нановезикулы с помощью азотной кавитации — образующиеся при этом мембранные везикулы оказываются приемлемыми с точки зрения и стабильности, и иммуногенности [42]. Однако насколько такие везикулы сравнимы по составу и функции с нативными бВВ, пока неясно.

*бВВ как иммунотерапевтические препараты для лечения онкологических заболеваний.* Использование бактерий для лечения онкологических заболеваний датируется началом 1890-х годов, когда Вильям Колле применил инъекции раствора с ослабленными бактериями для лечения больных [26]. Принимая во внимание то, что аттенуированные бактерии все-таки могут представлять потенциальный риск инфекции, бВВ как нереплицирующиеся элементы представляют менее опасную альтернативу соответствующего подхода. Однако потенциальная опасность применения бВВ при этом все-таки есть: она связана с тем, что везикулы транспортируют соединения широкого спектра — метаболиты, липополисахариды, белки, ДНК, РНК, в том числе малые РНК, определяющие возможность оперативного репрограммирования физиологии реципиентных клеток [35]. Вместе с тем, поскольку бВВ содержат разнообразные иммуностимулирующие молекулы, происходящие от исходных (родительских) бактерий [6, 3], они могут стимулировать подавление инфекции и опухоли.

В 2017 году способность бВВ к онкосупрессии была продемонстрирована корейскими исследователями [19]. Авторы показали, что введенные мышам ВВ, продуцируемые некоторыми видами бактерий-комменсалов, специфично накапливаются в опухолевых тканях и индуцируют противоопухолевый ответ, ассоциированный с активацией экспрессии фактора IFN- $\gamma$  и зависимых от него сигнальных путей. Тот факт, что IFN- $\gamma$  индуцирует и иммуносупрессивные факторы (такие как ингибиторы

контрольных точек иммунитета) в опухолевом микроокружении, потребовал предпринять дополнительные шаги: были созданы модифицированные ОМVs *E. coli*, которые содержат на своей поверхности эктодомен белка PD1 — негативного регулятора иммунореактивности. Эта модификация бВВ способствовала увеличению накопления бВВ в сайтах опухоли, блокаде PD1, усилению иммунного ответа (повышению уровня секреции провоспалительных цитокинов) и значимому ингибированию роста опухоли у мышей [23].

Для усиления реализации антиопухолевого потенциала предлагается декорировать бВВ опухолевыми антигенами, что обеспечивает возможность индукции специфичного иммунного ответа. Поскольку опухолевые антигены разнообразны и значительно варьируют у индивидов, использование какого-то одного антигена для лечения разных больных неэффективно. В этой связи модифицированные бВВ, несущие множественные опухолеспецифичные эпитопы, могли бы стать эффективными для широкого круга пациентов [14] — технологии для соответствующей модификации бВВ уже появились [9].

Способность бВВ к индукции эффективного иммунного ответа не исключает применения комбинированной терапии, направленной на усиление потенциала иммунотерапевтического препарата для полного уничтожения опухоли, предотвращения рецидивов и метастазов. В этой связи предлагается загрузка бВВ химиотерапевтическими средствами (например, доксорубицином, тегафуром) [45], дополнительная анти-PD1-иммунотерапия или фототермальная терапия, включение в бВВ фотосенситивных агентов (индоцианиновый зеленый, полидопамин). Авторы соответствующих работ уверены в том, что комбинация традиционных способов лечения с природными или модифицированными бВВ может существенно улучшить эффективность лечения онкозаболеваний. Рост количества публикаций об эффективности бВВ в качестве иммунотерапевтических препаратов для лечения онкологических заболеваний [46] может свидетельствовать о том, что убеждение в перспективности этого направления разделяют многие международные исследовательские группы. Однако возможность присутствия в бВВ широкого спектра физиологически активных соединений (в том числе малых РНК) с разнонаправленным действием в отношении иммунореактивности и опухолегенности [45] является серьезным препятствием для признания безопасности применения бВВ в клинике, особенно для лечения иммунокомпромиссных пациентов. В этой связи стандартизация аналитических методов для препаративного выделения, профилирования состава бВВ, а также и селекции

соответствующих наноструктур и оценки их безопасности является важнейшей задачей на пути клинического применения везикулярных инструментов.

*бВВ как средства доставки лекарственных препаратов.* По сравнению с хорошо исследованными синтетическими нанопереносчиками лекарственных препаратов, в частности, липосомами, бВВ, имея сходные характеристики в отношении размера, формы и структуры, оказываются более сложными в отношении мембранного бислоя (бВВ содержат разнообразные липиды и белки), а также содержимого и, соответственно, профиля поверхностных молекул, часть которых участвует в процессе таргетинга [3, 6]. Считается, что эти особенности могут определять существенные преимущества бВВ в отношении лекарственной доставки (табл. 1). Кроме того, по сравнению с липосомами, бВВ можно производить в больших количествах, используя ферментеры [25]. Однако все эти перспективы имеют смысл, если будут преодолены вышеуказанные проблемы, а также решены вопросы загрузки лекарств в бВВ, таргетинга и стабильности соответствующих наноструктур в кровотоке.

Для загрузки бВВ используют два подхода: пре-загрузка и постзагрузка [45]. Несмотря на имеющиеся варианты подходов, низкая эффективность в отношении загрузки бВВ пока остается проблемой. Возможность транспортировать молекулы на удаленные (относительно родительской бактерии) расстояния, а также способность таргетинга специфичных сайтов, безусловно, являются важным преимуществом бВВ относительно липосом. Впрочем, таргетинговые способности бВВ нуждаются в усилении, если имеется в виду перспектива клинического применения этих наноструктур. Один из способов решения проблемы — добавление молекул таргетинга в соответствующие бВВ. Например, покрытие бВВ *Salmonella* и *E. coli* пептидами (Arg-Gly-Asp) приводит к увеличению везикулярного таргетинга опухолевых клеток мышей в 2,5 и 11 раз соответственно [8, 15]. Однако далеко не всегда этот способ будет эффективным, поскольку клетки, не являющиеся мишенями, тоже могут экспрессировать подобные рецепторы. Для преодоления этой проблемы создана наноплатформа гибридных (эукариотно-прокариотных) ВВ: образующиеся везикулы несут различные опухолевые антигены, что повышает специфичность таргетинга, а накопление гибридных везикул в опухолевых клетках оказывается на порядок выше, чем в случае нативных бВВ [41]. Помимо этого, предлагаются и другие варианты инжиниринга, связанные с разными приемами покрытия бВВ наночастицами для усиления таргетинга, а также решения проблемы стабильности бВВ [49].

## Основные преимущества и недостатки липосом и ВВ как переносчиков лекарственных препаратов

Преимущества/Недостатки	Переносчик		
	Липосомы	ВВ эукариот	ВВ бактерий
Экономичность	+	-	-
Биодоступность и биосовместимость	-	+	+
Масштабируемость	+	-	+
Таргетинг	+	+	+
Контролируемое высвобождение лекарств	+	-	-
Возможность модификации содержимого, поверхностных молекул и др.	+	+	+
Возможность загрузки нескольких соединений	-	+	+
Низкий уровень поглощения клетками	+	-	-
Макрофаг-опосредованная гепатотоксичность	+	-	-
Низкий уровень экзогенной загрузки	-	+	+
Низкая стабильность в кровотоке	-	+	+
Проблема гетерогенности	-	+	+
Иммуногенность	+	+	+
Токсичность	+	-	+
Неспецифические эффекты	-	+	+
Проблемы неиммуногенного характера	-	+	-
Низкая способность пересечения био-барьеров	+	-	-
Естественная способность пересечения био-барьеров	-	+	+
Отсутствие возможности регуляции высвобождения везикул	-	+	+

В принципе, для увеличения стабильности бВВ может быть использован полиэтиленгликоль (ПЭГ), но такой метод малоэффективен в отношении опухолей [8]. В этом случае предлагается инкапсулировать бВВ — покрыть их «наноскорлупой» из фосфата кальция, что не только нейтрализует кислую среду опухолевого окружения, но и способствует накоплению бВВ в сайтах опухоли [33]. При этом посредством встраивания в «наноскорлупу» лигандов опухолевых мишеней, таких как фолиевая кислота, можно увеличить уровень таргетинга опухолевых клеток везикулами, что было продемонстрировано авторами в модельных экспериментах.

Очевидно, что пластичность поверхности бВВ — источник разнообразных опций для повышения эффективности доставки лекарственных средств с помощью соответствующих наноструктур [45]. С ней связывают перспективы улучшения стабильности, таргетинга и загрузки бВВ, включая возможность слияния липосом, загруженных лекарствами, с гибридными ВВ или с бВВ [41, 45]. Недавно появилось сообщение о производстве дизайнерских гибридных ВВ имплантированными клетками [21]. Эта технология открывает принципиально новый путь производства модифицированных бВВ *in vivo* — непосредственно в организме — и делает бВВ особенно притягательным инструментом для доставки

новых лекарственных препаратов, таких как нуклеиновые кислоты. Однако возникающие при этом вопросы, связанные с влиянием модификаций бВВ на стабильность содержимого, а также функции и, соответственно, безопасность наноструктур, пока остаются открытыми.

*бВВ как антибактериальные агенты и диагностические маркеры.* Наиболее важным видом средств антибактериальной защиты, помимо вакцин, являются антибиотики. Глобальная проблема антибиотикостойчивости диктует необходимость поиска новых типов антимикробных препаратов. Некоторые соединения, входящие в состав бВВ, в том числе продуцируемых пробиотическими бактериями, открывают возможность использования везикул в качестве антибактериальных средств нового типа [13]. Эффективность выделенных из пробиотиков ВВ против ряда патогенов (бактерий, грибов и вирусов) продемонстрирована в исследованиях *in vitro* и *in vivo* [16]. Однако возможность перехода на клинический уровень предполагает решение проблем, связанных с безопасностью, препаративным выделением и стабильностью везикул.

Наиболее безопасным с точки зрения клинического приложения сегодня считают диагностический потенциал бВВ. К настоящему времени получены многочисленные данные, свидетельствующие, что за-

болевания, ассоциированные с изменениями микробиома, отражаются в везикулярном профиле биофлюидов [17]. Наличие специфичных бВВ в слюне, моче и/или сыворотке крови может ассоциироваться с наличием и специфическим статусом инфекции. Это обстоятельство определяет биомаркерный потенциал бВВ для разработки неинвазивных диагностических методов, актуальных для клинической диагностики [20]. Кроме того, есть данные, свидетельствующие о бВВ как перспективных диагностических маркерах аллергии, болезни Альцгеймера, а также онкологических и респираторных заболеваний [46]. Наконец, показано, что модуляция профиля бВВ отражает изменения микробиомного и метаболомного статуса организма [18]. Это обстоятельство открывает перспективы использования бВВ в качестве клинических диагностикомов нового типа. Однако и в этом случае на пути перехода бВВ в клинику стоят проблемы. Одна из них заключается в необходимости сложного дорогостоящего оборудования (для омикс-профилирования) и высококвалифицированного персонала, в том числе биоинформатиков, готовых обрабатывать Big Data [11]. Кроме того, для ответа на вопрос, какие именно характеристики бВВ могут являться надежными предвестниками и/или высокоспецифичными маркерами конкретных патологических процессов, требуются дополнительные исследования. Наконец, актуальными остаются и некоторые вышеуказанные проблемы.

Как уже отмечалось, наличие небактериальных ВВ в грубых экстрактах может существенно искажать результаты анализа. Каким образом можно снизить интерференцию эукариотических ВВ в клинических образцах? Очевидно, что для этого должна быть решена проблема выделения и очистки бВВ. Недавно для выделения и очистки бВВ из биофлюидов было предложено использовать комбинацию методов — UC, SEC и DGC [38]. Однако сложность и высокая времязатратность такого подхода ограничивают возможность его клинического применения. Есть альтернативный подход, основанный на платформах с аптамерной детекцией. Однако приемлемость применения этой высокочувствительной технологии (позволяющей обнаружить до 25 нг/мл бВВ в образце) для клинического материала требует валидации [34]. В принципе, возможно применение и классического анализа анти-бВВ антител, основанного на использовании метода ELISA. Этот подход уже используется для диагностики заболеваний легких (определяется титр анти-бВВ антител — чистые бВВ, выделенные из бактериальной культуры, используют для оценки связывания с антителами в сыворотке крови) [47]. Однако

существенным недостатком серологического теста, как известно, является неопределенность статуса инфекционного процесса (актуальная инфекция или же перенесенная ранее), что в итоге затрудняет интерпретацию данных и может приводить к некорректным заключениям. В отличие от других практических приложений, использование бВВ в качестве диагностических инструментов, безусловно, представляется самым безопасным, но отсутствие простого, быстрого и эффективного (в том числе экономически) метода детекции бВВ в клинических образцах создает основное препятствие и его клиническому использованию.

### Заключение

Очевидно, что внедрение бВВ в клиническую практику требует оперативного решения обозначенных проблем. Самые важные вопросы касаются:

1. Безопасности бВВ.
2. Приемлемой модификации наноструктур для улучшения показателей их функции и снижения токсигенности.
3. Разработки и стандартизации методов получения, очистки и анализа везикул.
4. Создания экономически эффективного процесса производства бВВ.

Успех решения этих проблем может определить развитие не просто новых, но прорывных направлений биомедицины.

### Литература

1. Музыкантов А.А., Рожина Э.В., Фахруллин Р.Ф., Гомзикова М.О., Золотых М.А., Чернова О.А., Чернов В.М. Внеклеточные везикулы микоплазм способны проникать в клетки эукариот *in vitro* и модулировать их протеом // *Acta Naturae*. — 2021. — Т. 13. — № 4. — С. 82–88.
2. Ahmed A.A.Q., Zheng R., Abdalla A.M.E., Bakadia B.M., Qi F., Xiao L., Atta O.M., Mao L., Yang G. Heterogeneous populations of outer membrane vesicles released from *Helicobacter pylori* SS1 with distinct biological properties // *Eng. Sci.* — 2021. — Vol. 15. — P. 148–165
3. Avila-Calderón E.D., Ruiz-Palma M.D.S., Aguilera-Arreola M.G., Velázquez-Guadarrama N., Ruiz E.A., Gomez-Lunar Z., Witonsky S., Contreras-Rodríguez A. Outer membrane vesicles of Gram-negative bacteria: An outlook on biogenesis // *Front. Microbiol.* — 2021. — Vol. 12. — Art. 557902. doi: 10.3389/fmicb.2021.557902.
4. Benne N., van Duijn J., Kuiper J., Jiskoot W., Slütter B. Orchestrating immune responses: How size, shape and rigidity

- affect the immunogenicity of particulate vaccines // *J. Control Release*. — 2016. — Vol. 234. — P. 124–134.
5. Bottero D., Gaillard M.E., Zurita E., Moreno G., Martinez D.S., Bartel E., Bravo S., Carriquiriborde F., Errea A., Castuma C., Rumbo M., Hozbor D. Characterization of the immune response induced by pertussis OMVs-based vaccine // *Vaccine*. — 2016. — Vol. 34. — P. 3303–3309.
  6. Briaud P., Carroll R.K. Extracellular vesicle biogenesis and functions in Gram-positive bacteria // *Infect. Immun.* — 2020. — Vol. 88. — e00433–20. doi: 10.1128/IAI.00433-20.
  7. Brown H.L., Clayton A., Stephens P. The role of bacterial extracellular vesicles in chronic wound infections: Current knowledge and future challenges // *Wound Repair Regen.* — 2021. — Vol. 29. — P. 864–880.
  8. Chen Q., Bai H., Wu W., Huang G., Li Y., Wu M., Tang G., Ping Y. Bioengineering bacterial vesicle-coated polymeric nanomedicine for enhanced cancer immunotherapy and metastasis prevention // *Nano Lett.* — 2020. — Vol. 20. — P. 11–21.
  9. Cheng K., Zhao R., Li Y., Qi Y., Wang Y., Zhang Y., Qin H., Qin Y., Chen L., Li C., Liang J., Li Y., Xu J., Han X., Anderson G.J., Shi J., Ren L., Zhao X., Nie G. Bioengineered bacteria-derived outer membrane vesicles as a versatile antigen display platform for tumor vaccination via Plug-and-Display technology // *Nat. Commun.* — 2021. — Vol. 12. — Art. 2041. doi: 10.1038/s41467-021-22308-8.
  10. Chernov V.M., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., Medvedeva E.S., Grygorieva T.Y., Trushin M.V., Vishnyakov I.E., Sabantsev A.V., Borchsenius S.N., Chernova O.A. Extracellular membrane vesicles secreted by mycoplasma *Acholeplasma laidlawii* PG8 are enriched in virulence proteins // *J. Proteomics*. — 2014. — Vol. 110. — P. 117–128.
  11. Chiu C.Y., Miller S.A. Clinical metagenomics // *Nat. Rev. Genet.* — 2019. — Vol. 20. — P. 341–355.
  12. Dauros Singorenko P., Chang V., Whitcombe A., Simonov D., Hong J., Phillips A., Swift S., Blenkinsop C. Isolation of membrane vesicles from prokaryotes: a technical and biological comparison reveals heterogeneity // *J. Extracell. Vesicles*. — 2017. — Vol. 6. — Art. 1324731. doi: 10.1080/20013078.2017.1324731.
  13. Domínguez Rubio A.P., D'Antoni C.L., Piuri M., Pérez O.E. Probiotics, their extracellular vesicles and infectious diseases // *Front. Microbiol.* — 2022. — Vol. 13. — Art. 864720. doi: 10.3389/fmicb.2022.864720.
  14. Grandi A., Tomasi M., Zanella I., Ganfini L., Caproni E., Fantappiè L., Irene C., Frattini L., Isaac S.J., König E., Zerbini F., Tavarini S., Sammicheli C., Giusti F., Ferlenghi I., Parri M., Grandi G. Synergistic protective activity of tumor-specific epitopes engineered in bacterial outer membrane vesicles // *Front. Oncol.* — 2017. — Vol. 7. — Art. 253. doi: 10.3389/fonc.2017.00253.
  15. Gu T.W., Wang M.Z., Niu J., Chu Y., Guo K.R., Peng L.H. Outer membrane vesicles derived from *E. coli* as novel vehicles for transdermal and tumor targeting delivery // *Nanoscale*. — 2020. — Vol. 12(36). — P. 18965–18977.
  16. Jahromi L.P., Fuhrmann G. Bacterial extracellular vesicles: understanding biology promotes applications as nanopharmaceuticals // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 2021. — Vol. 173. — P. 125–140.
  17. Jones E., Stentz R., Telatin A., Savva G.M., Booth C., Baker D., Rudder S., Knight S.C., Noble A., Carding S.R. The origin of plasma-derived bacterial extracellular vesicles in healthy individuals and patients with inflammatory bowel disease: A pilot study // *Genes (Basel)*. — 2021. — Vol. 12. — Art. 1636. doi: 10.3390/genes12101636.
  18. Kim D.J., Yang J., Seo H., Lee W., Ho Lee D., Kym S., Park Y.S., Kim J.G., Jang I.J., Kim Y.K., Cho J.Y. Colorectal cancer diagnostic model utilizing metagenomic and metabolomic data of stool microbial extracellular vesicles // *Sci. Rep.* — 2020. — Vol. 10. — Art. 2860. doi: 10.1038/s41598-020-59529-8.
  19. Kim O.Y., Park H.T., Dinh N.T.H., Choi S.J., Lee J., Kim J.H., Lee S.W., Cho Y.S. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- $\gamma$ -mediated antitumor response // *Nat. Commun.* — 2017. — Vol. 8(1). — Art. 626. doi: 10.1038/s41467-017-00729-8.
  20. Kim S.I., Kang N., Leem S., Yang J., Jo H., Lee M., Kim H.S., Dhanasekaran D.N., Kim Y.K., Park T., Song Y.S. Metagenomic analysis of serum microbe-derived extracellular vesicles and diagnostic models to differentiate ovarian cancer and benign ovarian tumor // *Cancers (Basel)*. — 2020. — Vol. 12(5). — Art. 1309. doi: 10.3390/cancers12051309.
  21. Kojima R., Bojar D., Rizzi G., Hamri G.C., El-Baba M.D., Saxena P., Ausländer S., Tan K.R., Fussenegger M. Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment // *Nat. Commun.* — 2018. — Vol. 9(1). — Art. 1305. doi: 10.1038/s41467-018-03733-8.
  22. Larson J.A., Howie H.L., So M. *Neisseria meningitidis* accelerates ferritin degradation in host epithelial cells to yield an essential iron source // *Mol. Microbiol.* — 2004. — Vol. 53. — P. 807–820.
  23. Li Y., Zhao R., Cheng K., Zhang K., Wang Y., Zhang Y., Li Y., Liu G., Xu J., Xu J., Anderson G.J., Shi J., Ren L., Zhao X., Nie G. Bacterial outer membrane vesicles presenting programmed death 1 for improved cancer immunotherapy via immune activation and checkpoint inhibition // *ACS Nano*. — 2020. — Vol. 14. — P. 16698–16711.
  24. Liao Z., Muth D.C., Eitan E., Travers M., Learman L.N., Lehrmann E., Witwer K.W. Serum extracellular vesicle depletion processes affect release and infectivity of HIV-1 in culture // *Sci. Rep.* — 2017. — Vol. 7. — Art. 2558. doi: 10.1038/s41598-017-02908-5.
  25. Liu H., Zhang Q., Wang S., Weng W., Jing Y., Su J. Bacterial extracellular vesicles as bioactive nanocarriers for drug delivery: Advances and perspectives // *Bioact. Mater.* — 2021. — Vol. 14. — P. 69–181.
  26. Losier T.T., Akuma M., McKee-Muir O.C., LeBlond N.D., Suk Y., Alsaadi R.M., Guo Z., Reshke R., Sad S., Campbell-

- Valois F.X., Gibbings D.J., Fullerton M.D., Russell R.C. AMPK promotes xenophagy through priming of autophagic kinases upon detection of bacterial outer membrane vesicles // *Cell Rep.* — 2019. — Vol. 26. — P. 2150–2165.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.062.
27. Micoli F., MacLennan C.A. Outer membrane vesicle vaccines // *Semin. Immunol.* — 2020. — Vol. 50. — Art. 101433. doi: 10.1016/j.smim.2020.101433.
28. Mouzykantov A., Medvedeva E., Baranova N., Lopuhov V., Usachev K., Chernova O., Chernov V. Data on the genome and proteome profiles of ciprofloxacin-resistant *Acholeplasma laidlawii* strains selected under different conditions in vitro // *Data Brief.* — 2020. — Vol. 33. — Art. 106412. doi: 10.1016/j.dib.2020.106412.
29. Mulcahy L.A., Pink R.C., Carter D.R. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake // *J. Extracell. Vesicles.* — 2014. — Vol. 3. doi: 10.3402/jev.v3.24641.
30. Ohno H., Murano A. Serum-free culture of *H. pylori* intensifies cytotoxicity // *World J. Gastroenterol.* — 2007. — Vol. 13. — P. 532–537.
31. Olofsson A., Vallström A., Petzold K., Tegtmeyer N., Schleucher J., Carlsson S., Haas R., Backert S., Wai S.N., Gröbner G., Arnqvist A. Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles // *Mol. Microbiol.* — 2010. — Vol. 77. — P. 1539–1555.
32. Prior J.T., Davitt C., Kurtz J., Gellings P., McLachlan J.B., Morici L.A. Bacterial-derived outer membrane vesicles are potent adjuvants that drive humoral and cellular immune responses // *Pharmaceutics.* — 2021. — Vol. 13. — Art. 131. doi: 10.3390/pharmaceutics13020131.
33. Qing S., Lyu C., Zhu L., Pan C., Wang S., Li F., Wang J., Yue H., Gao X., Jia R., Wei W., Ma G. Biomimetic bacterial outer membrane vesicles potentiate safe and efficient tumor microenvironment reprogramming for anticancer therapy // *Adv. Mater.* — 2020. — Vol. 32. — e2002085. doi: 10.1002/adma.202002085.
34. Samra M.S., Lim D.H., Han M.Y., Jee H.M., Kim Y.K., Kim J.H. Bacterial microbiota-derived extracellular vesicles in children with allergic airway diseases: Compositional and functional features // *Allergy Asthma Immunol. Res.* — 2021. — Vol. 13. — P. 56–74.
35. Sartorio M.G., Pardue E.J., Feldman M.F., Haurat M.F. Bacterial outer membrane vesicles: From discovery to applications // *Annu. Rev. Microbiol.* — 2021. — Vol. 75. — P. 609–630.
36. Sierra G.V., Campa H.C., Varcacel N.M., Garcia I.L., Izquierdo P.L., Sotolongo P.F., Casanueva G.V., Rico C.O., Rodriguez C.R., Terry M.H. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba // *NIPH Ann.* — 1991. — Vol. 14. — P. 195–207; discussion 208–210.
37. Song Q., Yu H., Han J., Lv J., Lv Q., Yang H. Exosomes in urological diseases — Biological functions and clinical applications // *Cancer Lett.* — 2022. — Vol. 544. — Art. 215809. doi: 10.1016/j.canlet.2022.215809.
38. Tulkens J., De Wever O., Hendrix A. Analyzing bacterial extracellular vesicles in human body fluids by orthogonal biophysical separation and biochemical characterization // *Nat. Protoc.* — 2020. — Vol. 15. — P. 40–67.
39. Turner L., Bitto N.J., Steer D.L., Lo C., D'Costa K., Ramm G., Shambrook M., Hill A.F., Ferrero R.L., Kaparakis-Liaskos M. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicle size determines their mechanisms of host cell entry and protein content // *Front. Immunol.* — 2018. — Vol. 9. — Art. 1466. doi: 10.3389/fimmu.2018.01466.
40. Vanaja S.K., Russo A.J., Behl B., Banerjee I., Yankova M., Deshmukh S.D., Rathinam V.A.K. Bacterial outer membrane vesicles mediate cytosolic localization of LPS and caspase-11 activation // *Cell.* — 2016. — Vol. 165. — P. 1106–1119.
41. Wang D., Liu C., You S., Zhang K., Li M., Cao Y., Wang C., Dong H., Zhang X. Bacterial vesicle-cancer cell hybrid membrane-coated nanoparticles for tumor specific immune activation and photothermal therapy // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* — 2020. — Vol. 12. — P. 41138–41147.
42. Wang S., Gao J., Li M., Wang L., Wang Z. A facile approach for development of a vaccine made of bacterial double-layered membrane vesicles (DMVs) // *Biomaterials.* — 2018. — Vol. 187. — P. 28–38.
43. Wang S., Khan A., Huang R., Ye S., Di K., Xiong T., Li Z. Recent advances in single extracellular vesicle detection methods // *Biosens. Bioelectron.* — 2020. — Vol. 154. — Art. 112056. doi: 10.1016/j.bios.2020.112056.
44. Wu G., Ji H., Guo X., Li Y., Ren T., Dong H., Liu J., Liu Y., Shi X., He B. Nanoparticle reinforced bacterial outer-membrane vesicles effectively prevent fatal infection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* // *Nanomedicine.* — 2020. — Vol. 24. — Art. 102148. doi: 10.1016/j.nano.2019.102148.
45. Wu M., Wang M., Jia H., Wu P. Extracellular vesicles: emerging anti-cancer drugs and advanced functionalization platforms for cancer therapy // *Drug Deliv.* — 2022. — Vol. 29. — P. 2513–2538.
46. Xie J., Li Q., Haesebrouck F., Van Hoecke L., Vandebroucke R.E. The tremendous biomedical potential of bacterial extracellular vesicles // *Trends Biotechnol.* — 2022. — Vol. 40(10). — P. 1173–1194.
47. Yang J., Hong G., Kim Y.S., Seo H., Kim S., McDowell A., Lee W.H., Kim Y.S., Oh Y.M., Cho Y.S., Choi Y.W., Kim Y.Y., Jee Y.K., Kim Y.K. Lung disease diagnostic model through IgG sensitization to microbial extracellular vesicles // *Allergy Asthma Immunol. Res.* — 2020. — Vol. 12. — P. 669–683.
48. Zavan L., Bitto N.J., Johnston E.L., Greening D.W., Kaparakis-Liaskos M. *Helicobacter pylori* growth stage determines the size, protein composition, and preferential cargo

- packaging of outer membrane vesicles // *Proteomics*. — 2019. — Vol. 19. — e1800209. doi: 10.1002/prot.201800209.
49. Zeng Y., Li S., Zhang S., Wang L., Yuan H, Hu F. Cell membrane coated-nanoparticles for cancer immunotherapy // *Acta Pharm. Sin. B*. — 2022. — Vol. 12. — P. 3233–3254.
  50. Zhang H., Zhang Y., Song Z., Li R., Ruan H., Liu Q., Huang X. sncRNAs packaged by *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles attenuate IL-8 secretion in human cells // *Int. J. Med. Microbiol.* — 2020. — Vol. 310. — Art. 151356. doi: 10.1016/j.ijmm.2019.151356.
- ## References
1. Muzykantov AA, Rozhina EV, Fakhrullin RF, Gomzikova MO, Zolotykh MA, Chernova OA, Chernov VM. Vnekletochnyye vezikuly mikoplazm sposobny pronikat' v kletki eukariot in vitro i modulirovat' ikh proteom. *Acta Naturae* 2021; 13(4):82–88 (in Russian).
  2. Ahmed AAQ, Zheng R, Abdalla AME, Bakadia BM, Qi F, Xiao L, Atta OM, Mao L, Yang G. Heterogeneous populations of outer membrane vesicles released from *Helicobacter pylori* SS1 with distinct biological properties. *Eng Sci* 2021; 15:148–165
  3. Avila-Calderón ED, Ruiz-Palma MDS, Aguilera-Arreola MG, Velázquez-Guadarrama N, Ruiz EA, Gomez-Lunar Z, Witonsky S, Contreras-Rodríguez A. Outer membrane vesicles of Gram-negative bacteria: An outlook on biogenesis. *Front Microbiol* 2021; 12:557902. doi: 10.3389/fmicb.2021.557902.
  4. Benne N, van Duijn J, Kuiper J, Jiskoot W, Slütter B. Orchestrating immune responses: How size, shape and rigidity affect the immunogenicity of particulate vaccines. *J Control Release* 2016; 234:124–134.
  5. Bottero D, Gaillard ME, Zurita E, Moreno G, Martinez DS, Bartel E, Bravo S, Carriquiriborde F, Errea A, Castuma C, Rumbo M, Hozbor D. Characterization of the immune response induced by pertussis OMVs-based vaccine. *Vaccine* 2016; 34:3303–3309.
  6. Briaud P, Carroll RK. Extracellular vesicle biogenesis and functions in Gram-positive bacteria. *Infect Immun* 2020; 88:e00433–20. doi: 10.1128/IAI.00433-20.
  7. Brown HL, Clayton A, Stephens P. The role of bacterial extracellular vesicles in chronic wound infections: Current knowledge and future challenges. *Wound Repair Regen* 2021; 29:864–880.
  8. Chen Q, Bai H, Wu W, Huang G, Li Y, Wu M, Tang G, Ping Y. Bioengineering bacterial vesicle-coated polymeric nanomedicine for enhanced cancer immunotherapy and metastasis prevention. *Nano Lett* 2020; 20:11–21.
  9. Cheng K, Zhao R, Li Y, Qi Y, Wang Y, Zhang Y, Qin H, Qin Y, Chen L, Li C, Liang J, Li Y, Xu J, Han X, Anderson GJ, Shi J, Ren L, Zhao X, Nie G. Bioengineered bacteria-derived outer membrane vesicles as a versatile antigen display platform for tumor vaccination via Plug-and-Display technology. *Nat Commun* 2021; 12:2041. doi: 10.1038/s41467-021-22308-8.
  10. Chernov VM, Mouzykantov AA, Baranova NB, Medvedeva ES, Grygorieva TY, Trushin MV, Vishnyakov IE, Sabantsev AV, Borchsenius SN, Chernova OA. Extracellular membrane vesicles secreted by mycoplasma *Acholeplasma laidlawii* PG8 are enriched in virulence proteins. *J Proteomics* 2014; 110:117–128.
  11. Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics. *Nat Rev Genet* 2019; 20:341–355.
  12. Dauros Singorenko P, Chang V, Whitcombe A, Simonov D, Hong J, Phillips A, Swift S, Blenkiron C. Isolation of membrane vesicles from prokaryotes: a technical and biological comparison reveals heterogeneity. *J Extracell Vesicles* 2017; 6:1324731. doi: 10.1080/20013078.2017.1324731.
  13. Domínguez Rubio AP, D'Antoni CL, Piuri M, Pérez OE. Probiotics, their extracellular vesicles and infectious diseases. *Front Microbiol* 2022; 13:864720. doi: 10.3389/fmicb.2022.864720.
  14. Grandi A, Tomasi M, Zanella I, Ganfini L, Caproni E, Fantappiè L, Irene C, Frattini L, Isaac SJ, König E, Zerbini F, Tavarini S, Sammiceli C, Giusti F, Ferlenghi I, Parri M, Grandi G. Synergistic protective activity of tumor-specific epitopes engineered in bacterial outer membrane vesicles. *Front Oncol* 2017; 7:253. doi: 10.3389/fonc.2017.00253.
  15. Gu TW, Wang MZ, Niu J, Chu Y, Guo KR, Peng LH. Outer membrane vesicles derived from *E. coli* as novel vehicles for transdermal and tumor targeting delivery. *Nanoscale* 2020; 12(36):18965–18977.
  16. Jahromi LP, Fuhrmann G. Bacterial extracellular vesicles: understanding biology promotes applications as nanopharmaceuticals. *Adv Drug Deliv Rev* 2021; 173:125–140.
  17. Jones E, Stentz R, Telatin A, Savva GM, Booth C, Baker D, Rudder S, Knight SC, Noble A, Carding SR. The origin of plasma-derived bacterial extracellular vesicles in healthy individuals and patients with inflammatory bowel disease: A pilot study. *Genes (Basel)* 2021; 12:1636. doi: 10.3390/genes12101636.
  18. Kim DJ, Yang J, Seo H, Lee W, Ho Lee D, Kym S, Park YS, Kim JG, Jang IJ, Kim YK, Cho JY. Colorectal cancer diagnostic model utilizing metagenomic and metabolomic data of stool microbial extracellular vesicles. *Sci Rep* 2020; 10:2860. doi: 10.1038/s41598-020-59529-8.
  19. Kim O.Y., Park H.T., Dinh N.T.H., Choi S.J., Lee J., Kim J.H., Lee S.W., Gho Y.S. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- $\gamma$ -mediated antitumor response. *Nat Commun* 2017; 8(1):626. doi: 10.1038/s41467-017-00729-8.
  20. Kim SI, Kang N, Leem S, Yang J, Jo H, Lee M, Kim HS, Dhanasekaran DN, Kim YK, Park T, Song YS. Metagenomic analysis of serum microbe-derived extracellular vesicles and diagnostic models to differentiate ovarian cancer and benign ovarian tumor. *Cancers (Basel)* 2020; 12(5):1309. doi: 10.3390/cancers12051309.

21. Kojima R, Bojar D, Rizzi G, Hamri GC, El-Baba MD, Saxena P, Ausländer S, Tan KR, Fussenegger M. Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment. *Nat Commun* 2018; 9(1):1305. doi: 10.1038/s41467-018-03733-8.
22. Larson JA, Howie HL, So M. *Neisseria meningitidis* accelerates ferritin degradation in host epithelial cells to yield an essential iron source. *Mol Microbiol* 2004; 53:807–820.
23. Li Y, Zhao R, Cheng K, Zhang K, Wang Y, Zhang Y, Li Y, Liu G, Xu J, Xu J, Anderson GJ, Shi J, Ren L, Zhao X, Nie G. Bacterial outer membrane vesicles presenting programmed death 1 for improved cancer immunotherapy via immune activation and checkpoint inhibition. *ACS Nano* 2020; 14:16698–16711.
24. Liao Z, Muth DC, Eitan E, Travers M, Learman LN, Lehmann E, Witwer KW. Serum extracellular vesicle depletion processes affect release and infectivity of HIV-1 in culture. *Sci Rep* 2017; 7:2558. doi: 10.1038/s41598-017-02908-5.
25. Liu H, Zhang Q, Wang S, Weng W, Jing Y, Su J. Bacterial extracellular vesicles as bioactive nanocarriers for drug delivery: Advances and perspectives. *Bioact Mater* 2021; 14:69–181.
26. Losier TT, Akuma M, McKee-Muir OC, LeBlond ND, Suk Y, Alsaadi RM, Guo Z, Reshke R, Sad S, Campbell-Valois FX, Gibbins DJ, Fullerton MD, Russell RC. AMPK promotes xenophagy through priming of autophagic kinases upon detection of bacterial outer membrane vesicles. *Cell Rep* 2019; 26:2150–2165.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.062.
27. Micoli F, MacLennan CA. Outer membrane vesicle vaccines. *Semin Immunol* 2020; 50:101433. doi: 10.1016/j.smim.2020.101433.
28. Mouzykantov A, Medvedeva E, Baranova N, Lopuhov V, Usachev K, Chernova O, Chernov V. Data on the genome and proteome profiles of ciprofloxacin-resistant *Acholeplasma laidlawii* strains selected under different conditions in vitro. *Data Brief* 2020; 33:106412. doi: 10.1016/j.dib.2020.106412.
29. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 2014; 3. doi: 10.3402/jev.v3.24641.
30. Ohno H, Murano A. Serum-free culture of *H. pylori* intensifies cytotoxicity. *World J Gastroenterol* 2007; 13:532–537.
31. Olofsson A, Vallström A, Petzold K, Tegtmeyer N, Schleucher J, Carlsson S, Haas R, Backert S, Wai SN, Gröbner G, Arnqvist A. Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles. *Mol Microbiol* 2010; 77:1539–1555.
32. Prior JT, Davitt C, Kurtz J, Gellings P, McLachlan JB, Morici LA. Bacterial-derived outer membrane vesicles are potent adjuvants that drive humoral and cellular immune responses. *Pharmaceutics* 2021; 13:131. doi: 10.3390/pharmaceutics13020131.
33. Qing S, Lyu C, Zhu L, Pan C, Wang S, Li F, Wang J, Yue H, Gao X, Jia R, Wei W, Ma G. Biomaterialized bacterial outer membrane vesicles potentiate safe and efficient tumor microenvironment reprogramming for anticancer therapy. *Adv Mater* 2020; 32:e2002085. doi: 10.1002/adma.202002085.
34. Samra MS, Lim DH, Han MY, Jee HM, Kim YK, Kim JH. Bacterial microbiota-derived extracellular vesicles in children with allergic airway diseases: Compositional and functional features. *Allergy Asthma Immunol Res* 2021; 13:56–74.
35. Sartorio MG, Pardue EJ, Feldman MF, Haurat MF. Bacterial outer membrane vesicles: From discovery to applications. *Annu Rev Microbiol* 2021; 75:609–630.
36. Sierra GV, Campa HC, Varcacel NM, Garcia IL, Izquierdo PL, Sotolongo PF, Casanueva GV, Rico CO, Rodriguez CR, Terry MH. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann* 1991; 14:195–207; discussion 208–210.
37. Song Q, Yu H, Han J, Lv J, Lv Q, Yang H. Exosomes in urological diseases – Biological functions and clinical applications. *Cancer Lett* 2022; 544:215809. doi: 10.1016/j.canlet.2022.215809.
38. Tulkens J, De Wever O, Hendrix A. Analyzing bacterial extracellular vesicles in human body fluids by orthogonal biophysical separation and biochemical characterization. *Nat Protoc* 2020; 15:40–67.
39. Turner L, Bitto NJ, Steer DL, Lo C, D'Costa K, Ramm G, Shambrook M, Hill AF, Ferrero RL, Kaparakis-Liaskos M. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicle size determines their mechanisms of host cell entry and protein content. *Front Immunol* 2018; 9:1466. doi: 10.3389/fimmu.2018.01466.
40. Vanaja SK, Russo AJ, Behl B, Banerjee I, Yankova M, Deshmukh SD, Rathinam VAK. Bacterial outer membrane vesicles mediate cytosolic localization of LPS and caspase-11 activation. *Cell* 2016; 165:1106–1119.
41. Wang D, Liu C, You S, Zhang K, Li M, Cao Y, Wang C, Dong H, Zhang X. Bacterial vesicle-cancer cell hybrid membrane-coated nanoparticles for tumor specific immune activation and photothermal therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* 2020; 12:41138–41147.
42. Wang S, Gao J, Li M, Wang L, Wang Z. A facile approach for development of a vaccine made of bacterial double-layered membrane vesicles (DMVs). *Biomaterials* 2018; 187:28–38.
43. Wang S, Khan A, Huang R, Ye S, Di K, Xiong T, Li Z. Recent advances in single extracellular vesicle detection methods. *Biosens Bioelectron* 2020; 154:112056. doi: 10.1016/j.bios.2020.112056.
44. Wu G, Ji H, Guo X, Li Y, Ren T, Dong H, Liu J, Liu Y, Shi X, He B. Nanoparticle reinforced bacterial outer-membrane vesicles effectively prevent fatal infection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nanomedicine* 2020; 24:102148. doi: 10.1016/j.nano.2019.102148.
45. Wu M, Wang M, Jia H, Wu P. Extracellular vesicles: emerging anti-cancer drugs and advanced functionalization platforms for cancer therapy. *Drug Deliv* 2022; 29:2513–2538.
46. Xie J, Li Q, Haesebrouck F, Van Hoecke L, Vandenbroucke RE. The tremendous biomedical potential of bacterial extracellular vesicles. *Trends Biotechnol* 2022; 40(10):1173–1194.
47. Yang J, Hong G, Kim YS, Seo H, Kim S, McDowell A, Lee WH, Kim YS, Oh YM, Cho YS, Choi YW, Kim YY, Jee

- YK, Kim YK. Lung disease diagnostic model through IgG sensitization to microbial extracellular vesicles. *Allergy Asthma Immunol. Res* 2020; 12:669–683.
48. Zavan L, Bitto NJ, Johnston EL, Greening DW, Kaparakis-Liaskos M. *Helicobacter pylori* growth stage determines the size, protein composition, and preferential cargo packaging of outer membrane vesicles. *Proteomics* 2019; 19:e1800209. doi: 10.1002/pmic.201800209.
49. Zeng Y, Li S, Zhang S, Wang L, Yuan H Hu F. Cell membrane coated-nanoparticles for cancer immunotherapy. *Acta Pharm Sin B* 2022; 12:3233–3254.
50. Zhang H, Zhang Y, Song Z, Li R, Ruan H, Liu Q, Huang X. sncRNAs packaged by *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles attenuate IL-8 secretion in human cells. *Int J Med Microbiol* 2020; 310:151356. doi: 10.1016/j.ijmm.2019.151356.

## BACTERIAL EXTRACELLULAR VESICLES FOR NEW TECHNOLOGIES IN BIOMEDICINE: PROBLEMS AND PROSPECTS

V.M. CHERNOV, A.A. MUZIKANTOV, N.B. BARANOVA, O.A. CHERNOVA

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics – a separate structural unit Federal Research Center «Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences», Kazan*

Bacterial extracellular vesicles (bEVs) are nanostructures surrounded by a lipid membrane and filled with components of bacterial origin. They play an important role in the physiology and pathogenesis of bacteria, in the processes of interaction between bacterial cells, as well as between bacterial and eukaryotic cells. Advances in biotechnology in recent years have determined the possibility of modifying the surface of bEV, «decorating» it with various biomolecules and nanoparticles to modulate their functions. Today, bEVs are in the focus of researchers in a wide range of biomedical fields as promising vaccines, immunotherapeutic drugs for the treatment of infectious and oncological diseases, as well as diagnostic markers and drug delivery vehicles. For the full disclosure of the clinical potential and the transition of bEV into practical medicine, it is necessary to resolve issues related to their safety and the production process. The review is devoted to the analysis of the successes and problems of the use of bEV in biomedicine and the discussion of possible ways of clinical translation of new technologies based on bEV.

*Keywords:* biomedicine, new technologies, bacterial extracellular vesicles, reviews.

### Address:

Muzikantov A.A., Ph.D.  
senior researcher, Kazan institute of biochemistry and biophysics –  
a separate structural unit Federal Research Center «Kazan Scientific  
Center of the Russian Academy of Sciences», Kazan  
E-mail: muzaleksei@mail.ru

### Для цитирования:

Чернов В.М., Музыкантиов А.А., Баранова Н.Б., Чернова О.А. Бактериальные внеклеточные везикулы для новых технологий в биомедицине: проблемы и перспективы. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2022; 18(4):48–61.

### For citation:

Chernov V.M., Muzikantov A.A., Baranova N.B., Chernova O.A. Bacterial extracellular vesicles for new technologies in biomedicine: problems and prospects. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2022; 18(4):48–61 (in Russian).

## СОВРЕМЕННЫЙ ОБЗОР ПРОИЗВОДСТВА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ

Ю.В. СИНЯГИНА\*, М.В. ОВЧИННИКОВА, О.С. ЗИНИНА,  
К.С. ГУМАЮНОВА, А.К. НИКИФОРОВ

ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

В обзоре представлены данные по практическому применению бактериофагов в лечении и диагностике инфекционных болезней, современное состояние фармацевтического рынка как отечественных, так и зарубежных диагностических и лечебно-профилактических фаговых препаратов. Приведен перечень выпускаемых препаратов бактериофагов с указанием спектра их действия.

*Ключевые слова:* бактериофаги, специфичность, литическая активность, диагностика, лечение.

### Введение

Бактериофаги — уникальные микроорганизмы, на основе которых созданы особые по своим свойствам и характеристикам группы лечебно-профилактических и диагностических препаратов. Являясь естественными хищниками бактерий, они эффективно используются в современном мире. Основным преимуществом фагов является их высокая специфичность к бактериям-мишеням, которая способствует получению бесконечного разнообразия препаратов бактериофагов с различными способами применения [16].

Сейчас ведутся работы по поиску новых и совершенствованию существующих бактериофагов на базе: НПО «Микроген», ГНУ ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии (г. Покров), Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (Саратов), ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт».

### Диагностические чумные и псевдотуберкулезные бактериофаги

На территории России находится 11 природных очагов чумы. Последний случай чумы у человека в России был зарегистрирован в 2016 году [26].

© 2022 г. Синягина Ю.В., Овчинникова М.В., Зинина О.С., Гумаюнова К.С., Никифоров А.К.

\* Автор для переписки:

Синягина Юлия Владимировна  
младший научный сотрудник ФКУН Российский противочумный институт «Микроб», Саратов  
E-mail: sinyagina1993u@mail.ru

Возбудители чумы и псевдотуберкулеза — бактерии, принадлежащие к роду *Yersinia*, являются близкородственными организмами; идентичность их геномов составляет 97–99%, что затрудняет дифференциальную диагностику инфекционных агентов [11]. Специалистами противочумного института «Микроб» для индикации чумного микроба разработаны и серийно выпускаются чумные бактериофаги: Покровской (П), Л-413С; для идентификации возбудителя псевдотуберкулеза — псевдотуберкулезный бактериофаг (табл. 1).

Таблица 1

### Чумные и псевдотуберкулезные диагностические бактериофаги

Наименование препарата	Назначение препарата
Бактериофаг диагностический чумной Покровской (П), лиофилизат для приготовления раствора для диагностических целей	Для идентификации возбудителя чумного микроба и дифференциации его от псевдотуберкулезного.
Бактериофаг диагностический чумной Л-413С, лиофилизат для приготовления раствора для диагностических целей	Для идентификации возбудителя чумного микроба и дифференциации его от псевдотуберкулезного микроба.
Бактериофаг диагностический псевдотуберкулезный, лиофилизат для приготовления раствора для диагностических целей	Для идентификации возбудителя псевдотуберкулеза.

Бактериофаг Покровской (П) является высокоспецифичным в диагностическом рабочем титре в отношении *Y. pestis*. Он был выделен в 1929 году М.П. Покровской из тканей зараженных чумой сусликов *Spermophilus sp.*

Применяется в России и странах СНГ в диагностических целях для выявления чумного микроба [39].

Бактериофаг Л-413С (Ларинский) является видоспецифичным в отношении *Y. pestis* и не способен к лизису псевдотуберкулезного микроба [33, 34].

Псевдотуберкулезный бактериофаг лизирует *Y. pseudotuberculosis* [33]. В настоящее время для повышения эффективности диагностики псевдотуберкулеза ведутся поиск и селекция специфичных бактериофагов в отношении возбудителя, позволяющих, в том числе, проводить дифференциацию патогена [17, 21].

Известно, что одним из недостатков фагодиагностики является относительная длительность проведения анализа (от 18 до 48 часов). Существенно сократить время исследования позволяет сочетание молекулярно-генетических методов диагностики и высокой специфичности бактериофагов. Так, из крови больного чумой бубонной формы был выделен бактериофаг ϕA1122, относящийся к семейству *Podoviridae*, который лизировал штаммы *Y. pestis* при температурах 21±1 °С и 37±1 °С, а также штаммы псевдотуберкулезного микроба, выращенные при температурах выше 28±1 °С [35, 36]. Такой вирулентный фаг использовался американским центром по контролю и профилактике заболеваний (Centers for Disease Control and Prevention — CDC) с целью идентификации чумного микроба [36]. Позднее бактериофаг

ϕA1122 был модифицирован во флуоресцентно меченный бактериофаг за счет введения гена *luxAB*. Его использование позволяет получать положительный сигнал о наличии патогена в исследуемом материале в течение 10–15 мин после добавления фага к культуре *Y. pestis* в режиме реального времени [37].

#### Диагностические холерные бактериофаги

Холера по-прежнему остается проблемой как отечественного, так и мирового здравоохранения, что определяет необходимость постоянного систематического и планового наблюдения за этой инфекцией как одного из основных компонентов эпидемиологического надзора [4]. В системе противохолерных мероприятий значительное место занимает бактериологический анализ, где неотъемлемой частью лабораторной диагностики холерных вибрионов является постановка пробы с фаговыми препаратами [23].

В противочумном институте «Микроб» разработаны и серийно выпускаются четыре зарегистрированных на территории РФ диагностических холерных препарата бактериофагов: фаг дифференциально-диагностический (ДДФ), бактериофаги диагностические холерные классический и эльтор, бактериофаги диагностические холерные эльтор *ctx+* и *ctx-*, бактериофаги диагностические холерные ТЭПВ-1-7 (табл. 2).

Таблица 2

#### Холерные диагностические бактериофаги

Наименование препарата	Назначение препарата
Бактериофаги диагностические холерные эльтор <i>ctx+</i> и <i>ctx-</i> , раствор для диагностических целей	Для ускоренной идентификации и дифференциации эпидемически опасных <i>ctx+</i> штаммов и эпидемически неопасных <i>ctx-</i> штаммов <i>V. cholerae</i> O1 биовара эльтор.
Фаг дифференциально-диагностический вида <i>V. cholerae</i> (ДДФ), лиофилизат для диагностических целей	Для идентификации вирулентных микроорганизмов <i>V. cholerae</i> O1 классического и эльтор биоваров, <i>V. cholerae</i> не O1, <i>V. albensis</i> и дифференциации их от микроорганизмов: <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Plesiomonas</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Pseudomonas</i> и <i>Escherichia</i> .
Бактериофаги диагностический холерный классический и эльтор, лиофилизат для диагностических целей	Для дифференциации штаммов <i>V. cholerae</i> O1 классического и эльтор биоваров.
Бактериофаги диагностические холерные ТЭПВ-1, ТЭПВ-2, ТЭПВ-3, ТЭПВ-4, ТЭПВ-5, ТЭПВ-6, ТЭПВ-7, раствор для диагностических целей	Для фаготипирования и фагодиагностики неагглютинирующихся холерной O1 сывороткой вибрионов, выделяемых от людей и из объектов внешней среды.

Все представленные холерные бактериофаги представляют собой поливалентные коктейли, состоящие из активных и специфичных вирулентных монофагов, обеспечивающих соответствующие аналитические характеристики каждому диагностическому препарату.

В последние годы все чаще выделяются штаммы, не обладающие чувствительностью к коммерческим

диагностическим холерным бактериофагам. Это, в свою очередь, указывает на снижение спектра литической активности бактериофагов, что затрудняет идентификацию и дифференциацию холерных вибрионов в целом.

Многолетние наблюдения показали, что утрата чувствительности холерного вибриона к гомологичному бактериофагу обеспечивает бактериальной клетке эколо-

гическую устойчивость в ходе эволюции [5]. По мнению многих исследователей, фагорезистентность связана с пребыванием микробов во внешней среде, которое сопровождается их глубокой изменчивостью [5, 24]. Угнетение физиологических функций или нарушение клеточного метаболизма и условий внутриклеточного развития фага являются еще одной из причин возникновения фагорезистентности [5]. В этой связи в целях совершенствования фагодиагностики холеры в Ростовском НИПЧИ ведутся исследования по выделению и изучению новых холерных бактериофагов, в том числе водных рас. Полученные экспериментальные образцы характеризуются высокой литической активностью и специфичностью в отношении холерных вибрионов О1 серогруппы классического и эльтор биоваров, что позволяет рассматривать их в качестве кандидатов для конструирования эффективных диагностических препаратов [27].

#### **Диагностические сибиреязвенные бактериофаги**

На территории Российской Федерации уровень заболеваемости сибирской язвой ограничен выявлением спорадических случаев инфекции. Это связано с надлежащим выполнением комплекса запланированных объемов профилактических мероприятий [30].

Основой таких мероприятий является выявление, учет, паспортизация и постоянное отслеживание эпизоотической и эпидемической активности стационарно неблагополучных пунктов (СНП) [19].

Общность свойств *B. anthracis* с близкородственными микроорганизмами рода *Bacillus* и устойчивое формирование спорных форм способствуют затруднительной идентификации сибиреязвенных бактерий и обуславливают проведение комплексного диагностического анализа [14].

Для лабораторной диагностики предложено несколько бактериофагов. Они отличаются спектром литической активности и специфичностью, которые определяют их диагностическую ценность [10].

Так, E.W. McCloy в 1951 году выделила фаг «Wp», специфичный для *B. anthracis* и лизирующий несколько штаммов *B. cereus*, а в 1955 г. E.R. Brown и W.B. Cherry выделили фаг «Гамма», лизирующий как капсульные, так и бескапсульные штаммы, но не инфицирующий *B. cereus*. Позднее был открыт фаг Cherry, который использовался для идентификации сибиреязвенного микроба, однако его родство с фагом Гамма оставалось неизвестным. Позднее в ходе определения нуклеотидных последовательностей выявлено, что геномы всех трех выделенных фагов оказались идентичными, за исключением трех переменных локусов [7].

Груз Е.В. в 1961 году из почвы г. Кишинева выделила сибиреязвенный бактериофаг «ВА-9», а в 1962 году Мещеряковым А.Я. был выделен аналогичный фаг «К-ВИЭВ». Оба экспериментальных бактериофага являлись специфичными препаратами к сибиреязвенному микробу.

В 1964 г. Ларина В.С. и Петрова Л.С. сообщили о выделении специфического фага «Саратов», который вызывал лизис штаммов *B. anthracis*, а из сапрофитов оказался чувствительным к фагу только один штамм *B. cereus*. Препарат сибиреязвенного бактериофага «Саратов» был выпущен только в экспериментальных сериях [10].

В 1967 г. на Туркменской противочумной станции был изолирован сибиреязвенный бактериофаг, обозначенный «186», что соответствовало порядковому номеру культуры. Он оказывал литическое действие на преобладающее большинство испытанных музейных штаммов сибирской язвы и вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ. Штаммы *B. cereus* были резистентны к экспериментальному препарату [8].

Васильевым П.Г. с соавт. (1999) открыты бактериофаги ФПГ, ФЮИ, ВИАЗ, обладающие широким спектром литической активности. Выделенные образцы были рекомендованы для использования в практике идентификации *B. anthracis* [3].

К настоящему времени детально изучена морфология частиц многих сибиреязвенных фагов, антигенные свойства бактериальных вирусов, кинетика их взаимодействия с микробной клеткой [7].

Сейчас в диагностических целях применяют сибиреязвенные бактериофаги: «Fah-ВНИИВВиМ», «R/D-Ph-6» и «Гамма А-26». По данным проведенных исследований, бактериофаг Fah-ВНИИВВиМ лизирует не менее 98% сибиреязвенных штаммов и не взаимодействует с другими видами бацилл [7].

На данный момент препарат «Fah-ВНИИВВиМ» производится в ГНУ «Всероссийский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии» Российской академии сельскохозяйственных наук и применяется в ветеринарной практике.

Позднее Поповой В.М. был получен сибиреязвенный бактериофаг «R/D-Ph-6», отличающийся высокой специфичностью и широким спектром литической активности, лизирующий только штаммы сибирской язвы [7].

Сотрудниками ФГУЗ Ставропольского НИПЧИ был предложен вариант сибиреязвенного бактериофага под названием «Гамма А-26». Экспериментально обоснована целесообразность применения данного препарата и разработана биотехнология его производства. В настоящее время бактериофаг «Гамма А-26» используется в лабораторной диагностике сибирской язвы [7].

В ходе сравнительного анализа свойств сибирезвенных бактериофагов было установлено, что повышение качества фагодиагностики сибирской язвы может быть достигнуто за счет комплексного применения бактериофагов «Гамма А-26» и «R/D-Rh-6». Для индикации *B. anthracis* в объектах окружающей среды целесообразно применять препарат фага «R/D-Rh-6», а для определения фаготипов штаммов возбудителя сибирской язвы использовать «Гамма А-26» и «186» [9].

#### **Диагностический бруцеллезный бактериофаг**

Эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу в России за последние десять лет характеризуется снижением уровня заболеваемости на фоне стойкого эпизоотологического неблагополучия по бруцеллезу среди крупного и мелкого рогатого скота. В Российской Федерации зарегистрировано 4610 неблагополучных пунктов по бруцеллезу КРС и 422 — по бруцеллезу овец и коз [28].

Первостепенное значение приобретает проблема заболеваемости бруцеллезом за счет создания акционерных, фермерских, индивидуальных хозяйств, что влечет за собой ослабление ветеринарного надзора и, как следствие, способствует активизации старых, а также возникновению новых очагов бруцеллеза [31].

Одним из путей решения проблемы предотвращения распространения бруцеллеза, является расширение знаний в области микробиологии возбудителя, а также совершенствование средств и методов его лабораторной диагностики, от чувствительности и специфичности которых зависят быстрота и своевременность постановки диагноза.

В России для лабораторной диагностики бруцеллеза применяют препарат зарегистрированный на территории РФ «Бактериофаги бруцеллезные диагностические жидкие», выпускаемый на базе ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, представляющий собой стерильные фильтраты фаголизатов бульонных культур бруцеллезных штаммов, содержащие взвесь частиц соответствующих фагов. Набор включает в себя четыре бактериофага бруцеллезных диагностических: Тбилиси (Тб), Weybridge (Wb), Firenze (Fi), Berkley (Bk2). Они предназначены для межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза. Межвидовая дифференциация штаммов бруцелл основана на определении эпидемически значимых видов (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. Suis*) [20]. Данный препарат позволяет с высокой точностью определять фагочувствительность бактерий рода *Brucella*.

#### **Экспериментальный диагностический туляремийный бактериофаг**

Ежегодно регистрируют от 100 и более случаев туляремии, при этом около 70% из них приходится на

Центральный, Северо-Западный и Сибирский федеральные округа [12].

Среди большого многообразия диагностических бактериофагов к различным особо опасным инфекциям, до сих пор стоит вопрос о наличии у возбудителя туляремии специфического бактериофага. Долгое время мнения исследователей о существовании бактериофага были разделены. Одни авторы утверждали, что у *F. tularensis* нет собственных фагов, а другие приводили данные об обнаружении феномена бактериофагии у туляремийного микроба [13, 18]. Обстоятельные исследования этого феномена туляремийного микроба выполнила О.С. Емельянова [15, 25]. По заключению автора, обнаруженный литический агент относился к умеренным фагам. Однако выделить и изучить туляремийный бактериофаг авторам не удалось.

Позднее был разработан экспериментальный туляремийный бактериофаг, впервые выделенный из органов морской свинки, инфицированной живой культурой туляремийного вакцинного штамма № 15 линии НИИЭГ [6]. Данный туляремийный бактериофаг обладает специфической литической активностью в отношении возбудителей туляремии трех подвидов (среднеазиатского, неарктического и голарктического), а также основных видов возбудителей болезни легионеров (*Legionella pneumophila*, *Legionella micdadei*, *Legionella bozemanii*, *Legionella dumoffii*). Важно отметить, что выделенный фаг не способен лизировать бактерии *Francisella novicida* — близкородственного по отношению к *F. tularensis* микроба. Туляремийный бактериофаг депонирован в коллекции фагов ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России» (г. Киров) под обозначением ГАЛ [6].

Для диагностики туляремии используются бактериологические, иммунологические и молекулярно-генетические методы исследования, но в схеме лабораторного анализа отсутствует диагностический бактериофаг, позволяющий в короткие сроки и с высокой степенью достоверности идентифицировать выделенную микробную культуру. Сегодня исследователи ведут экспериментальные работы по поиску, выделению и сохранению нового туляремийного бактериофага для улучшения качества лабораторной диагностики туляремии и повышения информативности анализа [29].

#### **Лечебно-профилактические бактериофаги**

В настоящее время в условиях тотальной антибиотикорезистентности микроорганизмов фаговые препараты используют для профилактики и лечения инфекционных болезней различной локализации и представляют достойную альтернативу антибиотикам [1].

Терапевтические бактериофаги имеют ряд преимуществ: высокая специфичность при лечении инфекций; отсутствие подавления нормальной микрофлоры без

нарушения естественного баланса внутренней среды организма; отсутствие токсических и аллергических эффектов; эффективность при монотерапии и синергизм в комбинации с другими препаратами, в том числе с антибиотиками и пробиотиками.

Сегодня Россия является мировым лидером по выпуску и терапевтическому применению эффективных антибактериальных средств на основе бактериофагов. Российский фармацевтический рынок по ассортименту бактериофагов представлен 64% продукции российского

производства и 28 и 8% производства Грузии и Армении соответственно [43]. Российское НПО «Микроген» корпорации «Ростех» — крупнейшее иммунобиологическое предприятие, выпускающее лечебно-профилактические фаговые препараты на трех производственных площадках: «Иммунопрепарат» г. Уфа, «ИмБио» г. Нижний Новгород, «Биомед» г. Пермь. Препараты на основе бактериофагов — монофаги, поливалентные фаги (фаговые коктейли) широкого спектра действия представлены в таблице 3.

Таблица 3

## Лечебно-профилактические бактериофаги

Наименование препарата	Спектр антибактериальной активности	Сфера применения
Пиобактериофаг поливалентный жидкий, Секстафаг	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Proteus</i> ( <i>P. vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i> ), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , энтеропатогенных <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Лечение и профилактика заболеваний, вызванных стафилококками, стрептококками, протееями, клебсиеллами, синегнойной и кишечной палочками.
Интести-бактериофаг	<i>Shigella flexneri</i> (сероваров 1, 2, 3, 4, 6), <i>Shigella sonnei</i> , <i>Salmonella enterica</i> (сероваров <i>Paratyphi A</i> , <i>Paratyphi B</i> , <i>Typhimurium</i> , <i>Infantis</i> , <i>Choleraesuis</i> , <i>Oranienburg</i> , <i>Enteritidis</i> ), энтеропатогенные <i>Escherichia coli</i> (серогрупп, наиболее значимых в этиологии кишечных инфекций), <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Лечение и профилактика заболеваний, вызванных стафилококками, стрептококками, протееями, клебсиеллами, синегнойной и кишечной палочками.
Пиобактериофаг поливалентный очищенный	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Лечение и профилактика различных форм гнойно-воспалительных заболеваний и инфекций ЖКТ.
Пиобактериофаг комплексный жидкий	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Proteus</i> ( <i>P. vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i> ), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , энтеропатогенных <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>	Лечение гнойно-воспалительных заболеваний, обработка операционных и свежееинфицированных ран.
Бактериофаг стрептококковый	<i>Streptococcus</i> spp.	Лечение и профилактика заболеваний, вызванных стрептококками.
Бактериофаг дизентерийный	<i>Shigella flexneri</i> (сероваров 1, 2, 3, 4, 6) и <i>Shigella sonnei</i>	Лечение и профилактика дизентерии.
Бактериофаг стафилококковый	Стерильные фаголизаты <i>Staphylococcus</i> spp.	Лечение и профилактика гнойно-воспалительных и кишечных заболеваний, вызванных стафилококками.
Бактериофаг псевдомонасаеругиноза (синегнойный)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Лечение и профилактика заболеваний, вызванных синегнойной палочкой.
Бактериофаг сальмонеллезный групп А, В, С, D, E	<i>Salmonella enterica</i> ( <i>Paratyphi A</i> и <i>B</i> , <i>Typhimurium</i> , <i>Choleraesuis</i> , <i>Infantis</i> , <i>Oranienburg</i> , <i>Enteritidis</i> )	Лечение заболеваний, вызванных сальмонеллами.
Бактериофаг клебсиелла поливалентный очищенный	<i>Klebsiella</i> ( <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. ozaenae</i> , <i>K. rhinoscleromatis</i> )	Лечение и профилактика заболеваний, вызванных клебсиеллами.
Бактериофаг коли	Патогенные штаммы <i>Escherichia coli</i>	Лечение и профилактика заболеваний, вызванных кишечной палочкой.
Бактериофаг протейный жидкий	<i>Proteus vulgaris</i> и <i>Proteus mirabilis</i>	Лечение и профилактика гнойно-воспалительных и кишечных заболеваний, вызванных протееями.
Бактериофаг колипротейный	<i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus mirabilis</i> и энтеропатогенные серогруппы <i>Escherichia coli</i>	Лечение и профилактика гнойно-воспалительных и кишечных заболеваний.

Сотрудниками Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского был разработан лечебно-профилактический коктейль бактериофагов «ФУДФАГ» в качестве биологически активной добавки (БАД), снижающий риск заражения острыми кишечными инфекциями [2]. Но поскольку бактериофаги являются препаратами выбора в антибактериальной терапии и применяются после определения фагочувствительности, применение бактериофагов в качестве БАДов, по мнению многих специалистов, является сомнительной перспективой.

За рубежом производство лечебных бактериофагов представлено Грузинской компанией «Биохимфарм» [42].

Во Франции и в США осуществлялся выпуск бактериофагов компаниями L'Oreal во Франции — 5 наименований препаратов и Eli Lilly в США — 6 разновидностей лекарственных фагосодержащих средств [38].

В Польше большой опыт фаготерапии имеют специалисты центра Института иммунологии и экспериментальной терапии им. Л. Хиршфельда (г. Вроцлав). Польские исследователи делают акцент на персонализированную терапию для экспериментального лечения пациентов с хроническими болезнями с высокой степенью антибиотикорезистентности. В результате клинических исследований была доказана высокая эффективность «индивидуальных» фаговых препаратов при лечении различных заболеваний бактериальной этиологии без каких-либо негативных побочных эффектов [32].

Препараты на основе бактериофагов представлены разнообразными формами выпуска. Большинство (75%) — это жидкие лекарственные формы, и только малая часть выпускается в твердой форме [22]. Однако спектр форм выпуска препаратов бактериофагов существенно шире, что может быть отнесено к безусловным преимуществам, особенно в сочетании с многообразием способов применения (прием внутрь, аппликации, орошение ран и слизистых оболочек). На данный момент разработаны такие лекарственные формы, как капсулы, спреи, гели, раневые губки, суппозитории.

На сегодняшний день бактериофаги нашли свое применение в стоматологической и дерматологической практике. При участии российских микробиологов на базе научно-производственного центра «Микромир» (г. Москва), сконструирован гель с бактериофагами «Фагодент» с доказанной эффективностью для предотвращения развития воспалительных заболеваний полости рта. Для нормализации микрофлоры кожи и предотвращения развития бактериальных инфекций кожных покровов разработаны дерматологические мази «Фагодерм» и «Искрафаг» [41].

Среди косметологических средств с бактериофагами можно выделить: «Гель-бальзам с бактериофагами», рекомендованный для препятствия размножению 20 патогенных микроорганизмов на коже, «Гелевая паста-апликатор для полости рта» — для предупреждения развития воспалительных заболеваний полости рта, эффективность применения которых подтверждена клиническими исследованиями.

Фаги играют большую роль в поддержании биологической безопасности продуктов питания, одновременно повышая уровень экологической чистоты продукции. Так, американская компания «Intralaytix» производит так называемые «санитарные» фаговые препараты, направленные на предотвращение размножения определенных видов бактерий, патогенных для человека и животных, которые могут присутствовать в пище [40].

Фаги разрешены к применению как добавки, их распыляют на продукты из мяса и домашней птицы, а также на овощи и фрукты [40].

Таким образом, бактериофаги представлены большой группой лечебно-профилактических препаратов и средств, с разнообразными лекарственными формами и способами применения. Массовое распространение бактериальных вирусов в природе значительно упрощает и персонализирует процесс конструирования новых фаговых препаратов, а обоснованное применение лечебных бактериофагов является эффективным направлением в антибактериальной терапии.

## Заключение

В настоящее время выпускается широкий спектр лечебно-профилактических фаговых препаратов, специфичных в отношении возбудителей различных инфекций, строго специфичных в отношении конкретных патогенов. В дальнейшем требуется поиск и разработка лечебно-профилактических препаратов на основе фагов, активных и специфичных в отношении соответствующих возбудителей в связи с возрастающей множественной бактериальной антибиотикорезистентностью.

В схеме лабораторной диагностики инфекционных заболеваний для индикации, идентификации и дифференциации возбудителей бактериофаги прочно заняли свою нишу благодаря своей экономичности, воспроизводимости, точности и скорости применения метода. Для повышения эффективности фагодиагностики ведутся разработки новых и совершенствование существующих препаратов.

## Литература

1. *Асланов Б.И.* Бактериофаги — Эффективные антибактериальные средства в условиях глобальной устойчивости к антибиотикам // *Медицинский совет.* — 2015. — № 13. — С. 106—110.
2. *Алешкин А.В. и др.* Специализированный продукт питания «Фудфаг» в профилактике пищевых инфекций. Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. Материалы Международной научно-практической конференции, Ульяновск, 23—25 апреля 2013 года. — Ульяновск: Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина, 2013. — С. 93—99.
3. *Васильев П.Г.* Спектр литической активности видоспецифического сибиреязвенного бактериофага ФПГ / Проблемы медицинской и экологической биотехнологии: сборник тезисов г. Оболенск. — 1999. — 33 с.
4. *Гаевская Н.Е., Кочеткова А.О.* Новые расы холерных бактериофагов, перспективные для использования в лабораторной диагностике холеры // *Клиническая лабораторная диагностика.* — 2017. — № 62(7). — С. 440—443.
5. *Гаевская Н.Е., Македонова Л.Д.* Использование бактериофагов в лабораторной диагностике холеры // *Клиническая лабораторная диагностика.* — 2016. — № 61(12). — С. 849—852.
6. *Григорьев А.А. и др.* Выделение и свойства туляремийного бактериофага Гал // *Проблемы особо опасных инфекций.* — 2008. — № 98. — С. 33—36.
7. *Головинская Т.М.* Биотехнологические и микробиологические аспекты совершенствования фагодиагностики сибирской язвы. Автореферат. — 2013. — С. 3—4.
8. *Головинская Т.М. и др.* Совершенствование фагодиагностики сибирской язвы: оценка специфичности бактериофага «186» // *Медицинский вестник Северного Кавказа.* — 2013. — № 8(1). — С. 68—69.
9. *Головинская Т.М. и др.* Разработка биотехнологии репродукции сибиреязвенных бактериофагов и сравнительная оценка стабильности их свойств и диагностической ценности // *Проблемы особо опасных инфекций.* — 2014. — № 2. — С. 104—107.
10. *Головинская Т.М. и др.* Сравнительное изучение литической активности и специфичности экспериментальных серий сибиреязвенных бактериофагов Гамма А-26, К-ВИЭВ, ВА-9 и Фаh-ВНИИВВиМ // *Проблемы особо опасных инфекций.* — 2011. — № 3(109). — С. 28—30.
11. *Демидова Г.В. и др.* Детекция возбудителя псевдотуберкулеза и его дифференциация от чумного микроба методом полимеразной цепной реакции // *Здоровье населения и среда обитания ЗНиСО.* — 2016. — № 4(277). — С. 39—41.
12. *Демидова Т.Н. и др.* Современная эпидемиологическая ситуация по туляремии в Северо-Западном федеральном округе России // *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* — 2016. — № 5(90). — С. 14—22.
13. *Домарадский И.В.* Проблемы патогенности франциселл // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* — 2005. — № 2. — С. 106—110.
14. *Еременко Е.И. и др.* Усовершенствование методов идентификации атипичных штаммов возбудителя сибирской язвы и их дифференциация от близкородственных бацилл // *Журнал гигиены, эпидемиологии, микробиологии и иммунологии.* — 2009. — № 3. — С. 76—80.
15. *Емельянова О.С.* О туляремийном бактериофаге // *Проблемы особо опасных инфекций.* — 1971. — № 3(19). — С. 202—206.
16. *Захаренко С.М.* Бактериофаги: Современные аспекты применения, перспективы на будущее // *Медицинский совет.* — 2013. — № 10. — С. 2—64.
17. *Катмакова Н.П. и др.* Поиск и селекция псевдотуберкулезных бактериофагов // *Ветеринарная медицина.* — 2009. — № 4. — С. 19—20.
18. *Колядицкая Л.С. и др.* О туляремийном бактериофаге // *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии.* — 1959. — № 3. — С. 13—16.
19. *Логвин Ф.В. и др.* Сибирская язва в мире, странах СНГ и Российской Федерации // *Медицинский вестник Юга России.* — 2017. — № 8(3). — С. 17—22.
20. *Ляпустина Л.В., Омельяничук П.А., Лямкин Г.И. и др.* Совершенствование технологии производства бруцеллезных диагностических бактериофагов // *Проблемы особо опасных инфекций.* — 2009. — № 3(101). — С. 69—72.
21. *Македонова Л.Д., Кудрякова Т.А., Качкина Г.В. и др.* Бактериофаги *Yersinia pseudotuberculosis*: обнаружение в штаммах различных О-сероваров и их идентификация. // *Клиническая лабораторная диагностика.* — 2013. — № 8. — С. 52—53.
22. *Никифоров А.К., Комиссаров А.В., Абрамова Е.Г. и др.* Твердые лекарственные формы биологических лекарственных препаратов. Вакцины, иммуноглобулины, пробиотики, бактериофаги (технологические особенности производства). Монография, Саратов, 2022. — 294 с.
23. *Онищенко Г.Г., Кутырев В.В.* Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. — М.: «Шико». — 2009. — С. 62—100.
24. *Овчинникова М.М., Аленкина Т.В., Коровкина Г.И. и др.* Изучение некоторых причин фагорезистентности эпидемически неопасных штаммов *V. cholerae* eltor к бактериофагу диагностическому холерному *ctx-* / Холера и патогенные для человека вибрионы. — Ростов-на-Дону. — 2010. — № 23. — С. 62—68.
25. *Олсуфьев Н.Г.* Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. Академия медицинских наук СССР. — М.: Медицина. — 1975. — 192 с.
26. *Попов Н.В., Ерошенко Г.А., Карнаухов И.Г.* Эпидемиологическая и эпизоотическая обстановка по чуме в Российской Федерации и прогноз ее развития на 2020—2025

- гг. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2020. — № 1. — С. 43–50.
27. Погужова М.П., Гаевская Н.Е., Водопьянов А.С. и др. Биологические свойства и генетическая характеристика экспериментальных диагностических бактериофагов *Vibrio cholerae* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2021. — № 98(3). — С. 291–297.
28. Пономаренко Д.Г., Скударева О.Н., Хачатурова А.А. Об эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в мире в 2011–2020 гг. и прогноз на 2021 г. в Российской Федерации // Проблемы особо опасных инфекций. — 2021. — № 2. — С. 41–51.
29. Разгулин С.А., Григорьев А.А. Туляремийный бактериофаг: выделение и основные биологические свойства // Медицинский Альманах. — 2011. — № 5(18). — С. 198–201.
30. Рязанова А.Г., Скударева О.Н., Герасименко Д.К. и др. Обзор эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по сибирской язве в 2020 г. в мире и прогноз на 2021 г. в Российской Федерации // Проблемы особо опасных инфекций. — 2021. — № 1. — С. 81–86.
31. Русанова Д.В., Лямкин Г.И. Эпидемиологические особенности бруцеллеза в Ставропольском крае // Проблемы особо опасных инфекций. — 2009. — № 3(101). — С. 27–30.
32. Тикунова Н.В., Власов В.В. Бактериофаги — враги наших врагов // Наука из первых рук. — 2013. — Т. 50(2). — С. 10–11.
33. Филиппов А.А., Эллиотт Дж.М., Бобров А.Г. и др. Определение нуклеотидной последовательности генома чумного диагностического бактериофага Л-413С // Проблемы особо опасных инфекций. — 2005. — № 2. — С. 49–52.
34. Garcia E., Chain P., Elliot J.M. Molecular characterization of L-413C, a P2-related plague diagnostic bacteriophage // Virology. — 2008. — No. 372. — P. 85–96.
35. Garcia E., Elliot J.M., Ramanculov E. The genome sequence of *Yersinia pestis* bacteriophage  $\phi$ A1122 reveals an intimate history with the coliphage T3 and T7 genomes // Journal of bacteriology. — 2003. — Vol. 185. — No. 17. — P. 5248–5262.
36. Kiljunen S., Datta N., Dentovskaya S.V. Identification of the Lipopolysaccharide core of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* as the receptor for bacteriophage  $\phi$ A1122 // Journal of bacteriology. — 2011. — Vol. 193(18). — P. 4963–4972.
37. Sergueev K.V., He Y., Borschel R.H. Rapid and sensitive detection of *Yersinia pestis* using amplification of plague diagnostic bacteriophages monitored by real-time PCR // PLoS One. — 2010. — Vol. 5(6). — e11337. doi: 10.1371/journal.pone.0011337.
38. Stone R. Bacteriophage therapy. Stalin's forgotten cure // Science. — 2002. — Vol. 298(5594). — P. 728–731.
39. Zhao X., Skurnik M. Bacteriophages of *Yersinia pestis* // Adv. Exp. Med. Biol. — 2016. — Vol. 918. — P. 361–375.
40. Электронный ресурс. — Режим доступа: <http://intralytix.com> (дата обращения 15.07.2022).
41. Электронный ресурс. — Режим доступа: <https://micromir.bio/products/fagodent> (дата обращения 18.07.2022).
42. Электронный ресурс. — Режим доступа: <http://biochimpharm.ge> (дата обращения 23.06.2022).
43. Электронный ресурс. — Режим доступа: <https://scienceforum.ru/2020/article/2018023166> (дата обращения 31.08.2022).

## References

1. Aslanov BI. Bakteriofagi — Effektivnyye antibakterial'nyye sredstva v usloviyakh global'noy ustoychivosti k antibiotikam. Meditsinskiy sovet 2015; 13:106–110 (in Russian).
2. Aleshkin AV i dr. Spetsializirovanny produkt pitaniya «Fudfag» v profilaktike pishchevykh infektsiy. Bakteriofagi: teoreticheskiye i prakticheskiye aspekty primeneniya v meditsine, veterinarii i pishchevoy promyshlennosti. Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, Ul'yanovsk, 23–25 aprelya 2013 goda. Ul'yanovsk: Ul'yanovskaya gosudarstvennaya sel'skokhozyaystvennaya akademiya im PA Stolypina, 2013:93–99 (in Russian).
3. Vasil'yev P.G. Spektr liticheskoy aktivnosti vidospetsificheskogo sibireyazvennogo bakteriofaga FPG. Problemy meditsinskoj i ekologicheskoy biotekhnologii: sbornik tezisov g. Obolensk 1999: 33 (in Russian).
4. Gayevskaya NYe, Kochetkova AO. Novyye rasy kholernykh bakteriofagov, perspektivnyye dlya ispol'zovaniya v laboratornoy diagnostike kholery. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika 2017; 62(7):440–443 (in Russian).
5. Gayevskaya NYe, Makedonova LD. Ispol'zovaniye bakteriofagov v laboratornoy diagnostike kholery. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika 2016; 61(12):849–852 (in Russian).
6. Grigor'yev AA i dr. Vydeleniye i svoystva tulyaremiynogo bakteriofaga Gal. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2008; 98:33–36 (in Russian).
7. Golovinskaya TM. Biotekhnologicheskiye i mikrobiologicheskiye aspekty sovershenstvovaniya fagodiagnostiki sibirskoy yazvy. Avtoreferat 2013: 3–4 (in Russian).
8. Golovinskaya TM i dr. Sovershenstvovaniye fagodiagnostiki sibirskoy yazvy: otsenka spetsifichnosti bakteriofaga «186». Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza 2013; 8(1):68–69 (in Russian).
9. Golovinskaya TM i dr. Razrabotka biotekhnologii reproduktcii sibireyazvennykh bakteriofagov i sravnitel'naya otsenka stabil'nosti ikh svoystv i diagnosticheskoy tsennosti. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2014; 2:104–107 (in Russian).
10. Golovinskaya TM i dr. Sravnitel'noye izucheniye liticheskoy aktivnosti i spetsifichnosti eksperimental'nykh seriy sibireyazvennykh bakteriofagov Gamma A-26, K-VIEV, VA-9 i Fah-VNIIIViM. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2011; 3(109):28–30 (in Russian).
11. Demidova GV i dr. Detektsiya vzbuditelya psevdotuberkuleza i yego differentsiatsiya ot chumnogo mikroba metodom polimeraznoy tsepnoy reaktsii. Zdorov'ye naseleniya i sreda obitaniya ZNiSO 2016; 4(277):39–41 (in Russian).

12. Demidova TN i dr. Sovremennaya epidemiologicheskaya situatsiya po tulyaremii v Severo-Zapadnom federal'nom okruge Rossii. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika* 2016; 5(90):14–22 (in Russian).
13. Domaradskiy IV. Problemy patogennosti frantsisell. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* 2005; 2:106–110 (in Russian).
14. Yeremenko YeI i dr. Usovershenstvovaniye metodov identifikatsii atipichnykh shtammov vzbuditelya sibirskoy yazvy i ikh differentsiatsiya ot blizkorodstvennykh batsill. *Zhurnal gigiyeny, epidemiologii, mikrobiologii i immunologii* 2009; 3:76–80 (in Russian).
15. Yemel'yanova OS. O tulyaremiynom bakteriofage. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 1971; 3(19):202–206 (in Russian).
16. Zakharenko SM. Bakteriofagi: Sovremennyye aspekty primeneniya, perspektivy na budushcheye. *Meditsinskiy sovet* 2013; 10:2–64 (in Russian).
17. Katmakova NP i dr. Poisk i selektsiya psevdotuberkuleznykh bakteriofagov. *Veterinarnaya meditsina* 2009; 4:19–20 (in Russian).
18. Kolyaditskaya LS i dr. O tulyaremiynom bakteriofage. *Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunobiologii* 1959; 3:13–16 (in Russian).
19. Logvin FV i dr. Sibirskaya yazva v mire, stranakh SNG i Rossiyskoy Federatsii. *Meditsinskiy vestnik Yuga Rossii* 2017; 8(3):17–22 (in Russian).
20. Lyapustina LV, Omel'yanchuk PA, Lyamkin GI i dr. Sovershenstvovaniye tekhnologii proizvodstva brutselleznykh diagnosticheskikh bakteriofagov. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2009; 3(101):69–72 (in Russian).
21. Makedonova LD, Kudryakova TA, Kachkina GV i dr. Bakteriofagi *Yersinia pseudotuberculosis*: obnaruzheniye v shtammakh razlichnykh O-serovarov i ikh identifikatsiya.. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2013; 8:52–53 (in Russian).
22. Nikiforov AK, Komissarov AV, Abramova YeG i dr. Tverdyye lekarstvennyye formy biologicheskikh lekarstvennykh preparatov. Vaktsiny, immunoglobuliny, probiotiki, bakteriofagi (tekhnologicheskyye osobennosti proizvodstva). *Monografiya, Saratov, 2022*: 294 (in Russian).
23. Onishchenko GG, Kutyrev VV. Laboratornaya diagnostika opasnykh infektsionnykh bolezney. *Prakticheskoye rukovodstvo*. Moscow: «Shiko» 2009; 62–100 (in Russian).
24. Ovchinnikova M.M., Alenkina T.V., Korovkina G.I. i dr. Izucheniye nekotorykh prichin fagorezistentnosti epidemicheskoi neopasnykh shtammov *V. cholerae* eltor k bakteriofagu diagnosticheskomu kholemomu *ctx-*. *Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony*. Rostov-na-Donu 2010; 23:62–68 (in Russian).
25. Olsuf'yev NG. Taksonomiya, mikrobiologiya i laboratornaya diagnostika vzbuditelya tulyaremii. *Akademiya meditsinskikh nauk SSSR*. Moscow: Meditsina 1975: 192 (in Russian).
26. Popov NV, Yeroshenko GA, Kamaukhov IG. Epidemiologicheskaya i epizooticheskaya obstanovka po chume v Rossiyskoy Federatsii i prognoz yeye razvitiya na 2020–2025 gg. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2020; 1:43–50 (in Russian).
27. Pogozhova MP, Gayevskaya NYe, Vodop'yanov AS i dr. Biologicheskyye svoystva i geneticheskaya kharakteristika eksperimental'nykh diagnosticheskikh bakteriofagov *Vibrio cholerae*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* 2021; 98(3):291–297 (in Russian).
28. Ponomarenko DG, Skudareva ON, Khachaturova AA. Ob epizootologo-epidemiologicheskoy situatsii po brutsellezu v mire v 2011–2020 gg. i prognoz na 2021 g. v Rossiyskoy Federatsii. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2021; 2:41–51 (in Russian).
29. Razgulin SA, Grigor'yev AA. Tulyaremiynyy bakteriofag: vydeleniye i osnovnyye biologicheskyye svoystva. *Meditsinskiy Al'manakh* 2011; 5(18):198–201 (in Russian).
30. Ryazanova AG, Skudareva ON, Gerasimenko DK i dr. Obzor epizootologo-epidemiologicheskoy situatsii po sibirskoy yazve v 2020 g. v mire i prognoz na 2021 g. v Rossiyskoy Federatsii. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2021; 1:81–86 (in Russian).
31. Rusanova DV, Lyamkin GI. Epidemiologicheskyye osobennosti brutselleza v Stavropol'skom kraye. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2009; 3(101):27–30 (in Russian).
32. Tikunova NV, Vlasov VV. Bakteriofagi – vragi nashikh vragov. *Nauka iz pervykh ruk* 2013; 50(2):10–11 (in Russian).
33. Filippov AA, Elliott DzhM, Bobrov AG i dr. Opredeleniye nukleotidnoy posledovatel'nosti genoma chumnogo diagnosticheskogo bakteriofaga L-413C. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2005; 2:49–52 (in Russian).
34. Garcia E, Chain P, Elliot JM. Molecular characterization of L-413C, a P2-related plague diagnostic bacteriophage. *Virology* 2008(372):85–96.
35. Garcia E, Elliot JM, Ramanculov E. The genome sequence of *Yersinia pestis* bacteriophage  $\phi$ A1122 reveals an intimate history with the coliphage T3 and T7 genomes. *Journal of bacteriology* 2003; 185(17):5248–5262.
36. Kiljunen S, Datta N, Dentovskaya SV. Identification of the Lipopolysaccharide core of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* as the receptor for bacteriophage  $\phi$ A1122. *Journal of bacteriology* 2011; 193(18):4963–4972.
37. Sergueev KV, He Y, Borschel RH. Rapid and sensitive detection of *Yersinia pestis* using amplification of plague diagnostic bacteriophages monitored by real-time PCR. *PLoS One* 2010; 5(6):e11337. doi: 10.1371/journal.pone.0011337.
38. Stone R. Bacteriophage therapy. Stalin's forgotten cure. *Science* 2002; 298(5594):728–731.
39. Zhao X, Skurnik M. Bacteriophages of *Yersinia pestis*. *Adv Exp Med Biol* 2016; 918:361–375.
40. Elektronnyy resurs. – URL: <http://intralytix.com> (data obrashcheniya 15.07.2022).
41. Elektronnyy resurs. – URL: <https://micromir.bio/products/fagodent> (data obrashcheniya 18.07.2022).
42. Elektronnyy resurs. – URL: <http://biochimpharm.ge> (data obrashcheniya 23.06.2022).
43. Elektronnyy resurs. – URL: <https://scienceforum.ru/2020/article/2018023166> (data obrashcheniya 31.08.2022).

## A MODERN REVIEW OF THE PRODUCTION OF DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC BACTERIOPHAGES

Yu.V. SINYAGINA, M.V. OVCHINNIKOVA, O.S. ZININA, K.S. GUMAYUNOVA, A.K. NIKIFOROV

*Russian Anti-Plague Institute «Microbe» Rospotrebnadzor, Saratov*

The review presents data on the practical use of bacteriophages in the treatment and diagnosis of infectious diseases, the modern state of the pharmaceutical market of both domestic and foreign diagnostic and therapeutic prophylactic phage preparations. The list of manufactured bacteriophage preparations is given, indicating the spectrum of their action.

*Keywords:* bacteriophages, specificity, lytic activity, diagnosis, treatment.

### **Address:**

Sinyagina Y.V.

Junior Researcher, Russian Anti-Plague Institute «Microbe»

E-mail: sinyagina1993u@mail.ru

### **Для цитирования:**

Синягина Ю.В., Овчинникова М.В., Зинина О.С., Гумаюнова К.С., Никифоров А.К. Современный обзор производства диагностических и лечебно-профилактических бактериофагов. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(4):62–71.

### **For citation:**

Sinyagina Yu.V., Ovchinnikova M.V., Zinina O.S., Gumayunova K.S., Nikiforov A.K. A modern review of the production of diagnostic and therapeutic bacteriophages. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(4):62–71 (in Russian).

## ЭФФЕКТИВНЫЕ СРЕДСТВА В БОРЬБЕ С ХОЛЕРОЙ В ЭПОХУ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

О.Ф. КРЕТЕНЧУК\*, М.В. ПОЛЕЕВА, В.А. КОРШЕНКО,  
Е.И. МАРКОВСКАЯ, О.С. ЧЕМИСОВА

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

В обзоре представлены данные литературы об эффективных средствах борьбы с холерой в эпоху антибиотикорезистентности, в том числе с применением современных технологий. Одной из альтернатив лечению антибиотиками считается бактериофаготерапия. Хорошо зарекомендовали себя и моноклональные антитела, связывающие патоген или его продукты в просвете кишечника. К эффективным мерам профилактики и лечения относится активация иммунной системы, обладающей значительными возможностями в формировании защитных реакций. Особый интерес вызывает использование лекарственных растений, пробиотиков и сорбентов. Принимая во внимание имеющиеся на сегодняшний день сведения, проблема поиска новых эффективных средств борьбы с холерой остается актуальной и требует скоординированного и многосекторального подхода.

**Ключевые слова:** холера, антибиотикорезистентность, бактериофаги, моноклональные антитела, пробиотики, сорбенты, экстракты лекарственных растений, иммуномодуляторы, биопленки, бинарные препараты.

### Введение

На современном этапе холера продолжает оставаться одной из актуальных, социально значимых и имеющих международное значение особо опасных инфекционных болезней, возможность завоза которой на территорию нашей страны сохраняется [10]. Ситуация по холере может осложняться происходящими в мире природными и техногенными катастрофами [14]. Вместе с тем нельзя не отметить реализацию резолюции семьдесят первой сессии Всемирной ассамблеи здравоохранения в поддержку борьбы с холерой, одобряющей стратегию «Ликвидация холеры: дорожная карта до 2030 г.» (<https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cholera>), призванную сократить смертность от этой инфекции. Меры по профилактике холеры и борьбе против нее требуют скоординированного и многосекторального подхода ([https://extranet.who.int/iris/restricted/bitstream/handle/10665/277199/A71\\_ACONF3Rev1-ru.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://extranet.who.int/iris/restricted/bitstream/handle/10665/277199/A71_ACONF3Rev1-ru.pdf?sequence=1&isAllowed=y)) и должны быть основаны не только на обеспечении населения чистой водой

и надлежащими условиями, на повышении санитарной культуры, на улучшении эпидемиологического надзора, но и на принятии эффективных мер противодействия инфекции. Одним из способов предупреждения и ликвидации эпидемий холеры является использование оральные холерных вакцин, которые в случае широкого применения способны обеспечивать защиту за счет развития популяционного иммунитета на эндемичных территориях [3]. Согласно Глобальной дорожной карте ВОЗ, массовая вакцинация должна помочь к 2030 году добиться снижения смертности от холеры на 90% в мире и элиминирования заболевания в 20 странах [5]. Несмотря на действенность специфической профилактики холеры, по ряду объективных причин вакцинация не может гарантировать абсолютную защиту. Следует учитывать и тенденцию роста антибиотикорезистентности, которая уже стала глобальной проблемой.

Как известно, *Vibrio cholerae* — естественный обитатель водной среды, являющейся резервуаром токсигенных штаммов холерных вибрионов в эндемичных районах, что не только увеличивает опасность формирования клонов, обладающих повышенным патогенетическим потенциалом, за счет горизонтального переноса генов, но и способствует возникновению и распространению лекарственной устойчивости. Так, R.S. Mohanraj et al. подтвердили перенос элемента SXT в ответ на действие ципрофлоксацина, тетрациклина и азитромицина обнаружением консервативных генов, специфичных для этого элемента [47]. Генетическая пластичность, характерная для холерных

© 2022 г. Кретенчук О.Ф., Полеева М.В., Коршенко В.А., Марковская Е.И., Чемисова О.С.

\* Автор для переписки:

Кретенчук Оксана Федоровна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела научного и учебно-методического обеспечения ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

e-mail: kretenchuk\_of@antiplague.ru

вибрионов, позволяет им адаптироваться к изменяющимся условиям и реагировать на широкий спектр стрессовых факторов, включая противомикробные препараты [55]. Исследования зарубежных и отечественных [16] ученых свидетельствуют о необходимости молекулярно-генетического мониторинга антибиотикорезистентности *V. cholerae*. Мета-анализ, проведенный Хh. Yuan et al. [57], показал низкий уровень устойчивости холерных вибрионов к некоторым антибиотикам, включая фторхинолоны, гентамицин, цефтриаксон, доксициклин, канамицин и цефотаксим. Тем не менее устойчивость к противомикробным препаратам у *V. cholerae* растет, особенно в странах с низким уровнем дохода или эндемичных районах. Для контроля развития и увеличения резистентных штаммов холерных вибрионов решающее значение приобретают как непрерывный надзор и ограничение неправильного использования антибиотиков с обязательным определением антибиотикограммы возбудителя, так и необходимость поиска альтернативных средств борьбы с холерой, которые могут или предупредить риск инфицирования, или повлиять на течение и исход болезни.

Цель настоящего обзора — анализ данных источников литературы по использованию перспективных средств борьбы с холерой, в том числе с применением современных технологий.

В настоящее время можно выделить следующие альтернативные подходы к терапии инфекционных заболеваний: поиск новых форм противомикробных соединений (использование бактериофагов, моноклональных антител, пробиотиков, сорбентов, бактериоцинов, экстрактов лекарственных растений); активация иммунной системы (иммуномодуляторы); коррекция антибиотикотерапии и профилактики с учетом персистирующих форм бактериальных патогенов (биопленки); направленная доставка антибиотиков (липосомы, протеины) и создание их эффективных комбинаций (бинарные препараты, антибиотики двойного действия — гетеродимерные структуры на основе препаратов разных классов) [2].

### **Бактериофаги**

Одним из перспективных направлений в борьбе с холерой является фаготерапия [1]. Бактериофаги природных штаммов и искусственно синтезированные генетически модифицированные фаги с новыми свойствами, инфицирующие и обезвреживающие бактериальные клетки [6], обладают такими преимуществами, как: специфичность; высокая активность в отношении резистентных штаммов микроорганизмов; способность свободно проникать в ткани организма человека и животного, не ослабляя иммунитет; отсутствие побочных эффектов, аллергических ре-

акций и возрастных ограничений. Для лучшего понимания того, как может распространяться инфекционный агент, была разработана математическая модель, описывающая роль бактериофагов в контроле за вспышками холеры. Использование литического фага, специфичного для *V. cholerae*, будет способствовать снижению концентрации бактерий, уменьшая и число инфицированных людей. Такие теоретические результаты позволяют сделать ряд эмпирически проверяемых прогнозов и установить «точку равновесия без болезней» [37, 39].

Изучением возможности создания фаговых профилактических и лечебных препаратов занимаются ученые во всем мире. S. Bhandare et al. провели исследование эффективности применения бактериофага Phi\_1 для лечения (введение фага per os с помощью катетера через 6–8 часов после заражения *V. cholerae* O1) и профилактики холеры (введение фага per os с помощью катетера за 6 часов до заражения *V. cholerae* O1) на модели новорожденных кроликов [27]. У животных, обработанных фагами в количестве  $10^9$  БОЕ на кролика, не было клинических признаков болезни по сравнению с необработанной контрольной группой (69%), и количество бактерий в их кишечнике снижалось, что свидетельствует об эффективности такого препарата и перспективности дальнейших клинических испытаний на людях. A.N.W. Lim et al. выделили из образцов стула больного холерой вирулентный фаг ICP2, для которого требуется белковый рецептор (OmpU), и включили его в состав экспериментального профилактического коктейля [45].

Современные геномные и биоинформационные технологии способствуют целенаправленному моделированию процесса отбора высокоспецифичных и вирулентных фагов против патогенных микроорганизмов. Так, зарубежными исследователями был внедрен комплексный сравнительный геномный подход для получения четких геномных, функциональных характеристик фагов *V. cholerae* и идентификации потенциальных фагов для терапии холеры [26]. Результаты высокопроизводительного секвенирования с последующим биоинформационным анализом дали возможность не только установить размер генома бактериофагов, выделенных из двух токсигенных штаммов холерного вибриона из реки Куджа и пляжа Усенге в Кении, но и выявить ген *PhOH*, который ранее был обнаружен у морских цианофагов. Фаги проявляли литическую активность в отношении 15 штаммов холерного вибриона, находящихся в окружающей среде, и одного клинического штамма, что является основанием для их использования в качестве средства, обеззараживающего воду от патогенных холерных вибрионов и обладающего терапевтическим эффектом [46]. Отечественные исследователи провели

биологическую и генетическую характеристику холерных бактериофагов Rostov-1, Rostov-6, Rostov 7 и Rostov M3, зарегистрировав полные геномные последовательности в международной базе GenBank [15]. *Vibrio* фаги Rostov-1 и Rostov M3, являясь литическими, могут быть использованы для создания профилактических противохолерных препаратов [15, 19]. Введение смеси этих бактериофагов экспериментальным животным предотвращало инфицирование как штаммами, относящимися к биовару El Tor, так и штаммами биовара classical. Кроме того, показана высокая эффективность холерных фагов в отношении антибиотикорезистентного геноварианта *V. cholerae* El Tor на модели генерализованной формы инфекции у белых мышей (70% выживших животных). Препарат вводили перорально ( $10^9$  БОЭ/мл) один раз в сутки в течение трех дней перед заражением (профилактика) или одновременно с заражением (лечение) [18].

Возможность терапевтического использования бактериофагов позволила создать экспериментальный комплексный препарат против холеры, обладающий сорбционной активностью за счет природного полисахарида хитозана, концентрационный оптимум которого обеспечивал реализацию литических свойств бактериального вируса [13].

К сожалению, почти все исследования лечебно-профилактического эффекта бактериофагов проведены на экспериментальных моделях млекопитающих [56]. Пригодных для использования клинических данных в этой области мало, поэтому требуется дальнейшее изучение этого вопроса. Кроме того, необходимо учитывать существование у бактерий различных стратегий защиты от фаговой инфекции, включая модификацию рестрикции, abortивную инфекцию, изменение фазы рецепторов клеточной поверхности, индуцируемые фагом хромосомные островки и кластеризованные регулярно чередующиеся системы коротких палиндромных повторов (CRISPR)-Cas [49]. На сегодняшний день фаги не могут заменить антибиотики, но способность повышать восприимчивость к последним и возможность синергизма при совместном использовании [4, 30], не нарушая при этом естественный биоценоз различных систем организма, позволяют считать их успешной альтернативой антибиотикам.

### Моноклональные антитела

В настоящее время все чаще для лечения инфекционных заболеваний применяют биомедицинские клеточные продукты, к которым относятся и моноклональные антитела (МКА) [17, 48]. Использование МКА в качестве терапевтических агентов явилось для медицины стратегическим этапом в смене концепции лечения — от неспецифической

к таргетной терапии. На сегодняшний день практически во всех биотехнологических компаниях для создания моноклональных препаратов, в основном, используется эффективная технология фагового дисплея антител, включающая в себя следующие этапы: выделение мРНК из иммунных или интактных лимфоцитов, синтез на этой матрице переменных фрагментов генов легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов, объединение генов легких и тяжелых цепей с помощью олигонуклеотидного линкера, клонирование этих генов в фаг, инфицирование этим вектором *E. coli* [7]. В результате таких манипуляций представляется возможным получать универсальные библиотеки антител против любой молекулы достаточного размера, исключая ограничения иммунной системы [50], в том числе и к поверхностным антигенам холерных вибрионов.

Многочисленные исследования, подтверждающие корреляцию подвижности холерного вибриона со способностью вызывать заболевание [16], доказывают перспективность проведения иммунотерапии с применением МКА, связывающих патоген или его продукты в просвете кишечника. На моделях холеры у новорожденных мышей и кроликов пассивно вводимые антилиполисахаридные МКА, вырабатываемые у людей после перенесенного заболевания [25] и синтезированные ZAC-3 IgG или ZAC-3 Fab, направленные на консервативную область липополисахарида (ЛПС) *V. cholerae* (липид А), уменьшают колонизацию кишечного эпителия путем ингибирования подвижности бактерий и стимулирования агглютинации вибрионов [44]. В результате воздействия антител происходит изменение в экспрессии генов, что удалось установить благодаря секвенированию. Из 160 генов два с повышенной регуляцией заслуживают внимание: порин, связанный с вирулентностью и косвенно регулируемый *toxT*, и  $\sigma 54$ -зависимый фактор транскрипции, участвующий на поздних стадиях инфекции. По мнению ряда ученых [25], в просвете кишечника человека под действием антител бактерии становятся «гипоинфекционными» через сигнальный путь, который функционирует для подавления синтеза жгутиков. Кроме того, было показано, что и МКА, направленные к O-специфическому полисахариду, выделенные от людей, переживших холеру в Бангладеш, также ингибируют подвижность возбудителя. Однако свойства и защитный механизм функционально значимых антител на сегодняшний день четко не определены. R.C. Kauffman et al. модифицировали низкоаффинные и высокоаффинные антитела в разных изотипах и подклассах иммуноглобулинов и охарактеризовали влияние этих изменений на активность связывания, вибриоцидности, агглютинации и ингибирования подвижности. Полученные

исследователями результаты свидетельствуют о том, что не аффинность влияет на функциональную эффективность, а, скорее всего, определяющим фактором является уникальное стерическое взаимодействие между антителом и О-антигеном [41]. Но не только ЛПС-специфичные МКА обеспечивают защиту от *V. cholerae*. Так, были сгенерированы 138 рекомбинантных МКА, полученных из индуцированных холерой плазмобластов, — активированных антителосекретирующих клеток, появляющихся в кровотоке либо после инфекции, либо после вакцинации. Из 138 человеческих антител 24 были направлены к ЛПС, 49 — к холерному токсину, шесть — к сиалидазе; с ТсрА ни одно из полученных антител не связывалось. Чтобы оценить, могут ли сиалидазоспецифичные МКА играть функциональную роль в защите от холеры, их протестировали в анализе, измеряющем индуцируемую холерным токсином продукцию циклического АМФ в клеточной линии Сасо-2 толстой кишки человека. Все шесть антител уменьшали этот потенцирующий эффект, а три из них были способны полностью нейтрализовать эффект сиалидазы [42]. Проведенные исследования имеют значение не только для лучшего понимания репертуара и функции иммунного ответа на антигены *V. cholerae*, но и для решения вопросов, связанных с вакцинацией против холеры.

В последние годы технология получения человеческих МКА значительно усовершенствовалась за счет использования платформы, основанной на *Nicotiana benthamiana*, позволяющей сократить процесс от заражения растения до получения продукта до 10 дней. В результате этого при постоянной поставке растений реакция на вспышку инфекционного заболевания будет проведена в течение нескольких недель [52]. С использованием такой платформы были получены и охарактеризованы два химерных человеческих МКА 2D6, направленные к О-полисахаридному антигену Ogawa, и ZAC-3, распознающие кор/липидную часть ЛПС Ogawa и Inaba. Результаты исследований вибриоцидной активности, агглютинации и подвижности вибрионов свидетельствуют о перспективности применения МКА 2D6 и ZAC-3 в качестве терапевтических средств [44].

В настоящее время совершенствуются не только технологии и платформы конструирования МКА, но и способы их введения. D.E. Baranova et al. создали трансгенную линию мышей, в которой переменные области тяжелой и легкой цепей (Fv), специфичные для консервативного эпитопа в ядре/липиде А *V. cholerae* O1, экспрессировались в виде полноразмерного человеческого димерного IgA1 (ZAC-3) и секретировались в молоко самок, обладающее способностью пассивно защищать от экспериментальной

инфекции холеры у новорожденных мышей [24]. Молоко, содержащее ZAC-3, останавливало подвижность холерных вибрионов в полужидком агаре и жидких средах, эффективно способствовало бактериальной агглютинации и уменьшению колониеобразующих единиц *V. cholerae* O1, выделенных из кишечных лизатов через 12 часов после перорального заражения мышей. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности проведения иммунотерапии с применением МКА, связывающих патоген или его продукты в просвете кишечника. Хотя на сегодняшний день так до конца и не изучены механизмы защиты от холеры, обеспечиваемые предшествующей болезнью или вакцинацией, но исследования с применением современных технологий, позволяющих экспрессировать рекомбинантные белки, включая МКА, будут способствовать повышению эффективности профилактических средств для снижения частоты заражения холерным вибрионом.

### Пробиотики

Проблема расширения спектра противохолерных средств может быть решена за счет дополнительного использования недорогих, потенциально терапевтических средств — пробиотиков, одним из механизмов действия которых является выработка бактериоцинов, представляющих собой короткие токсичные пептиды, продуцируемые определенными видами бактерий и ингибирующие колонизацию и рост других. Как известно, микробиота кишечника тесно взаимодействует с нашей иммунной системой. У здоровых людей она обеспечивает защиту от инфекции с помощью таких механизмов, как секреция противомикробных препаратов, конкуренция за питательные вещества, поддержка целостности эпителиального барьера, внедрение бактериофагов и активация иммунитета [35]. На экспериментальной модели холеры показана профилактическая и лечебная эффективность 5 отобранных штаммов лактобацилл и 1 штамма бифидобактерий [8]. Перспективность применения пробиотиков в качестве дополнительных препаратов при холерной инфекции оценена и на клетках Сасо-2. Защитный эффект составил 57%, что было определено с помощью МТТ-анализа и дополнительно подтверждено морфологическим исследованием. Предварительная обработка клеток Сасо-2 *Lactobacillus acidophilus* перед воздействием *V. cholerae* снижала экспрессию СТХ-В примерно в 1,76 раза [23]. Исследователи отмечают не только противомикробные свойства пробиотиков, но и антибиопленочные: *Lactobacillus spp.*, выделенные из образцов фекалий здоровых детей, уменьшали адгезию холерных вибрионов, тормозили образование биопленок и действовали на сформированные биопленки *V. cholerae*. Кроме того, был оценен пробиотический потенциал всех

изолятов, которые показали более 90%-ную выживаемость в присутствии солей желчи и желудочного сока, образовывали биопленки и обладали высокой адгезивной способностью к клеточной линии кишечника НСТ-15 [43]. Это позволяет рекомендовать их в качестве безопасных дополнительных терапевтических средств при инфекционной диарее, вызванной холерными вибрионами.

### Сорбенты

Разработка новых методов лечения больных острыми кишечными инфекционными заболеваниями тесно связана с внедрением в клиническую практику энтеросорбции, являющейся составной частью эфферентной терапии. Имеющиеся на сегодняшний день результаты дают возможность предположить, что терапевтический эффект достигается за счет адсорбции целевых веществ, таких как бактериальные токсины и избыточные желчные кислоты, из кишечника с последующим полным удалением из организма [38]. Несмотря на значительное многообразие и возможность выбора современных энтеросорбционных препаратов, вопросы разработки новых комбинированных/комплексных энтеросорбентов, расширяющих спектр их лечебного и профилактического действия, актуальны и требуют для своего решения системных подходов [11]. Кроме того, большинство имеющихся энтеросорбентов не отличается селективностью по отношению к конкретным патологическим объектам, что сказывается на эффективности их применения. Отечественными учеными был сконструирован энтеросорбент, представляющий собой микрочастицы высокомолекулярного хитозана с иммобилизованными антиэнтеротоксическими иммуноглобулинами и проявляющий высокую специфическую активность в отношении холерного токсина [12]. Опыт на модели кроликов-сосунков при внутрикишечном введении холерного токсина продемонстрировал, что применение экспериментального препарата способствует купированию холерогенного синдрома и, как следствие, обеспечивает увеличение процента выживших животных [11]. Необходимость в дополнительных исследованиях кишечных адсорбентов и их потенциального использования в качестве дополнительного лечения или альтернативы антибиотикам остается и позволяет следовать принципу минимального неблагоприятного воздействия на организм больного.

### Лекарственные растения

Одним из источников противомикробных средств являются растения, которые содержат целый комплекс фармакологически активных соединений. В публикациях сообщалось об антисекреторных эффектах берберина, выделенного из *Berberis aristata*, флавоноидов *Chiranthodendron pentadactylon* Larreat, фенольного соеди-

нения *Terminalia chebula* и других [51]. В последние годы внимание исследователей привлекает монотерпеновый  $\alpha$ -терпинеол ( $\alpha$ -ТРН), обладающий высоким противодиарейным потенциалом у мышей с секреторной диареей, индуцированной холерным токсином. Этот монотерпен, содержащийся во многих эфирных маслах (померанцевое масло, камфорное масло, гераниевое масло, неролиевое масло, петигреневоое масло и др.), тормозил перистальтику кишечника, предотвращал накопление кишечной жидкости и уменьшал выделение воды и хлоридов в просвет кишечника. Кроме того,  $\alpha$ -ТРН всасывался вместе с кишечной жидкостью и оказывал внутриклеточное действие, блокируя каналы и транспортеры, и взаимодействовал с рецепторами GM1 и с самим токсином, что позволит использовать его в качестве перспективного препарата для лечения диареи после дальнейших исследований механизма его действия [34]. *Xylocarpus granatum* («мангровое дерево»), широко распространенное в прибрежных лесах Бенгалии, Бирмы, Малайского полуострова, Андамана и Африки, используется для лечения различных заболеваний, включая холеру [33]. Tahir U.I. et al. представили данные об антибактериальном потенциале фитохимикатов, ингибирующих регулятор экспрессии генов вирулентности, HarR. Для определения молекул с сильной аффинностью связывания отфильтровали два соединения: стрихногуцин А, бисиндольный алкалоид со стрихниновой субструктурой, выделенный из корней тропической лесной лианы *Strychnos icaja*, и галлуфлаванон, натуральный продукт, обнаруженный в *Semecarpus apacardium*, листовом дереве, близкородственном кешью. Авторы отметили антибактериальный потенциал исследуемых веществ, способных непосредственно воздействовать на вирулентность холерных вибрионов [54]. Очищенные флавоноиды из *Gilletiodendron glandulosum* обладали антимикробной активностью, обусловленной лизисом клеток и разрушением цитоплазматической мембраны [53]. Фарнезол, присутствующий во многих эфирных маслах (цитронелла, лимонная трава, роза и др.), может быть потенциальным кандидатом на разработку нового лекарственного средства для лечения диарейных заболеваний за счет антихолинергического, противовоспалительного и антисекреторного действия [32]. Кроме того, экстракты лекарственных растений могут усиливать действие антибактериальных средств [29]. Используя многогранный подход к борьбе с патогеном, проведена работа по созданию комбинации трав. Метанольные экстракты *Centella asiatica*, *Eccremocarpus scaber*, *Camellia sinensis*, *Holarrhena antidysenterica* значительно ингибировали образование биопленок. Кроме того, экстракты листьев *H.*

*antidysenterica*, коры *H. antidysenterica* и всего растения *E. scaber* и *C. asiatica* подавляли *aphA* или *aphB*, основные регуляторные гены, модулирующие как вирулентность, так и образование биопленки [40].

Подобные исследования антимикробного эффекта в отношении штаммов холерных вибрионов проводили и в нашей стране. Так, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии были изучены водные, водно-спиртовые и ацетоновые экстракты корней кермека, барбариса, солодки, обладающие различной антимикробной активностью в отношении штаммов *V. cholerae* El Tor, в том числе и антибиотикорезистентных [9]. Значительной активностью против вибрионов обладали *Eucalyptus camaldulensis*, *Psidium guajava*, *Rhodomyrtus tomentosa* и *Syzygium cumini* (семейство миртовых) [36]. Несмотря на многочисленные результаты по разработке лекарств на растительной основе, многие вопросы, касающиеся механизма действия биоактивных соединений или экстрактов и токсикологических аспектов, требуют дальнейших исследований, в том числе и с использованием традиционных продуктов питания и напитков [28].

#### Иммуномодуляторы

Для совершенствования профилактики и лечения инфекционных болезней применяют иммуномодуляторы, избирательно действующие на различные звенья иммунной системы [22]. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что иммуномодуляторы могут применяться и в виде монотерапии, и в комплексе с другими средствами. Отечественные ученые предложили для совершенствования специфической профилактики холеры подход с использованием комплекса вакцины и иммуномодулирующих препаратов [21]. Так, азоксимера бромид, натрия дезоксирибонуклеат, глюкозаминилмурамилдипептид обладали иммуномодулирующим действием на формирование поствакцинального противохолерного иммунитета и защищали мышей от генерализованной холеры [20]. Иммуностимулирующей активностью отличались и некоторые лекарственные растения [36]. На сегодняшний день наличие в арсенале практикующего врача подобных препаратов с доказанной клинической эффективностью поможет повысить уровень оказываемой пациенту помощи и ускорить выздоровление [22].

#### Заключение

Исходя из вышеизложенного, необходимо и дальше проводить поиск новых средств и стратегий борьбы с холерой, которые можно легко применять на практике, в том числе и с устойчивыми к антибиотикам штаммами микроорганизмов. Для решения этой проблемы должны быть рассмотрены все возможности расширения спектра

препаратов, учитывая инновационные подходы к разработке лекарств. Изучение взаимодействия комменсалов, необходимых для развития и поддержания здоровой иммунной системы, и патогенов открывает новые перспективы в разработке профилактических и терапевтических подходов к борьбе с холерой [31]. Однако в современных условиях медицина немыслима без антибиотиков, поэтому важными направлениями остаются работы по созданию эффективных комбинаций препаратов, коррекции антибиотикотерапии с учетом персистирующих форм возбудителя. Перспективным является и поиск новых мишеней (регулятор рецептора трансмембранного канала муковисцидоза (CFTR) *V. cholerae*, моносиалоганглиозид (GM1), энкефалиназа и другие), которые могут быть использованы для разработки новых лекарств против холеры [51].

#### Литература

1. Акимкин В.Г., Дарбеева О.С., Колков В.Ф. Бактериофаги: исторические и современные аспекты их применения: опыт и перспективы // Клиническая практика. — 2010. — № 4(4). — С. 48–54.
2. Андрюков Б.Г., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. Перспективные стратегии поиска новых средств борьбы с инфекционными заболеваниями // Антибиотики и Химиотерапия. — 2018. — Т. 63(1–2). — С. 44–55.
3. Беспалова И.А., Иванова И.А., Омельченко Н.Д. и др. Современное состояние специфической профилактики холеры // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2018. — Т. 17. — № 1(98). — С. 55–61.
4. Горшкова А.С., Дрюккер В.В., Сыкилинда Н.Н. Совместное воздействие бактериофагов и антибиотика на биопленку *Pseudomonas aeruginosa* // Антибиотики и Химиотерапия. — 2020. — Т. 65. — № 3–4. — С. 7–11.
5. Горяев А.А., Саяпина Л.В., Обухов Ю.И., Бондарев В.П. Эффективность и безопасность вакцин для профилактики холеры // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. — 2018. — Т. 18. — № 1(65). — С. 42–49.
6. Данилов А.И., Жаркова Л.П. Антибиотикорезистентность: аргументы и факты // Клиническая фармакология и терапия. — 2017. — Т. 26. — № 5. — С. 6–9.
7. Дыкман Л.А. Технология фагового дисплея антител / Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы международной научно-практической конференции. — Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. — Том 2. — С. 109–114.
8. Кругликов В.Д. Разработка критериев отбора пробиотических бактерий для расширения спектра доступных противохолерных средств // Проблемы особо опасных инфекций. — 2012. — № 4(114). — С. 69–72.

9. Маркина О.В., Максименко Е.В., Маркин Н.В. и др. Изучение состава экстрактов растений, обладающих антимикробным эффектом в отношении *Vibrio cholerae* El Tor, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 2016. — № 1. — С. 63–66.
10. Носков А.К., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А. и др. Холера: тенденции развития эпидемического процесса в 2021 г., прогноз на 2022 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2022. — № 1. — С. 24–34.
11. Овчинникова М.В., Абрамова Е.Г., Кириллова Т.Ю. и др. Антиоксидантная активность экспериментального противохолерного энтеросорбционного препарата in vivo // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2018. — Т. 14. — № 4. — С. 48–53.
12. Овчинникова М.В., Исляева М.Н., Николаев В.Г. и др. Оценка функциональной активности специфического противохолерного энтеросорбента // Проблемы особо опасных инфекций. — 2015. — № 2. — С. 83–86.
13. Овчинникова М.В., Коровкина Г.И., Зинина О.С. и др. Литические и сорбционные свойства экспериментальной смеси бактериофаг-хитозан // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2019. — Т. 15. — № 2. — С. 11–16.
14. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Щуковская Т.Н. и др. Специфическая профилактика холеры в современных условиях // Проблемы особо опасных инфекций. — 2011. — № 1(107). — С. 5–12.
15. Погожова М.П., Гаевская Н.Е., Водопьянов А.С. и др. Биологические свойства и генетическая характеристика экспериментальных диагностических бактериофагов *Vibrio cholerae* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 2021. — Т. 98. — № 3. — С. 290–297.
16. Селянская Н.А., Егуазарян Л.А., Ежова М.И. и др. Анализ устойчивости к антибактериальным препаратам холерных вибрионов, выделенных из объектов окружающей среды в России в 2019 г. // Антибиотики и химиотерапия. — 2021. — Т. 66. — № 3–4. — С. 4–11.
17. Смирнов В.С., Толоян А.А. Некоторые возможности иммунотерапии при коронавирусной инфекции // Инфекция и иммунитет. — 2020. — Т. 10. — № 3. — С. 446–458.
18. Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Селянская Н.А. и др. Активность препарата бактериофагов в отношении антибиотикорезистентных штаммов холерных вибрионов El Tor // Антибиотики и Химиотерапия. — 2018. — Т. 63. — № 7–8. — С. 29–32.
19. Тюрина А.В., Ларионова Л.В., Филиппенко А.В. и др. Оценка гуморального иммунного ответа на введение холерных бактериофагов у экспериментальных животных // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2022. — Т. 18. — № 2. — С. 36–41.
20. Филиппенко А.В., Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Труфанова А.А. Влияние иммуномодуляторов на формирование поствакцинального противохолерного иммунитета // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 2022. — Т. 99. — № 1. — С. 81–92.
21. Филиппенко А.В., Омельченко Н.Д., Пасюкова Н.И. и др. Совершенствование специфической профилактики холеры с помощью иммуномодуляторов // Медицинская иммунология. — 2021. — Т. 23. — № 4. — С. 915–920.
22. Хаитов Р.М. Иммуномодуляторы: мифы и реальность // Иммунология. — 2020. — Т. 41. — № 2. — С. 101–106.
23. Alamdary S.Z., Bakhshi B. *Lactobacillus acidophilus* attenuates toxin production by *Vibrio cholerae* and shigella dysenteriae following intestinal epithelial cells infection // Microb. Pathog. — 2020. — Vol. 149. — Art. 104543. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104543.
24. Baranova D.E., Chen L., Destrempe M. et al. Passive immunity to *Vibrio cholerae* O1 afforded by a human monoclonal IgA1 antibody expressed in milk // Pathogens and Immunity. — 2020. — Vol. 5(1). — P. 89–116.
25. Baranova D.E., Willsey G.G., Levinson K.J. et al. Transcriptional profiling of *Vibrio cholerae* O1 following exposure to human anti-lipopolysaccharide monoclonal antibodies // Pathog. Dis. — 2020. — Vol. 78(4). — Art. ftaa029. doi: 10.1093/femspd/ftaa029.
26. Barman R.K., Chakrabarti A., Dutta S. Screening of potential *Vibrio cholerae* bacteriophages for cholera therapy: A comparative genomic approach // Frontiers in Microbiology. — 2022. — Vol. 13. — Art. 803933. doi: 10.3389/fmicb.2022.803933.
27. Bhandare S., Colom J., Baig A. et al. Reviving phage therapy for the treatment of cholera // J. Infect. Dis. — 2019. — Vol. 219(5). — P. 786–794.
28. Bhattacharya D., Sinha R., Mukherjee P. et al. Anti-virulence activity of polyphenolic fraction isolated from Kombucha against *Vibrio cholerae* // Microb. Pathog. — 2020. — Vol. 140. — Art. 103927. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103927.
29. Bruns M.M., Kakarla P., Floyd J.T. et al. Modulation of the multidrug efflux pump EmrD-3 from *Vibrio cholerae* by *Allium sativum* extract and the bioactive agent allyl sulfide plus synergistic enhancement of antimicrobial susceptibility by *A. sativum* extract // Arch. Microbiol. — 2017. — Vol. 199(8). — P. 1103–1112.
30. Chen Q., Dharmaraj T., Cai P.C. et al. Bacteriophage and bacterial susceptibility, resistance, and tolerance to antibiotics // Pharmaceutics. — 2022. — Vol. 14(7). — Art. 1425. doi: 10.3390/pharmaceutics14071425.
31. Cho J.Y., Liu R., Macbeth J.C., Hsiao A. The interface of *Vibrio cholerae* and the gut microbiome // Gut Microbes. — 2021. — Vol. 13(1). — Art. 1937015. doi: 10.1080/19490976.2021.1937015.
32. da Costa D.S., Negreiros P.D.S., da Silva V.G. et al. Antidiarrheal activity of farnesol in rodents: Pharmacological actions and molecular docking // Eur. J. Pharmacol. — 2020. — Vol. 874. — Art. 172986. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.172986.

33. Dey D., Quispe C., Hossain R. et al. Ethnomedicinal use, phytochemistry, and pharmacology of *Xylocarpus granatum* J. Koenig // Evid. Based Complement Alternat. Med. – 2021. – Vol. 2021. – Art. 8922196. doi: 10.1155/2021/8922196.
34. Dos Santos Negreiros P., da Costa D.S., da Silva V.G. et al. Antidiarrheal activity of  $\alpha$ -terpineol in mice // Biomed. Pharmacother. – 2019. – Vol. 110. – P. 631–640.
35. Ducarmon Q.R., Zwitterink R.D., Hornung B.V.H. et al. Gut microbiota and colonization resistance against bacterial enteric infection // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2019. – Vol. 83(3). – e00007-19. doi: 10.1128/MMBR.00007-19.
36. Ghosh A.K., Panda S.K., Luyten W. Anti-vibrio and immune-enhancing activity of medicinal plants in shrimp: A comprehensive review // Fish Shellfish Immunol. – 2021. – Vol. 117. – P. 192–210.
37. Habees A.A., Aldabbas E., Bragazzi N.L., Kong J.D. Bacteria-bacteriophage cycles facilitate *Cholera* outbreak cycles: an indirect Susceptible-Infected-Recovered-Bacteria-Phage (iSIRBP) model-based mathematical study // J. Biol. Dyn. – 2022. – Vol. 16(1). – P. 29–43.
38. Howell C.A., Mikhalovsky S.V., Markaryan E.N., Khovanov A.V. Investigation of the adsorption capacity of the enterosorbent Enterogel for a range of bacterial toxins, bile acids and pharmaceutical drugs // Sci. Rep. – 2019. – Vol. 9(1). – Art. 5629. doi: 10.1038/s41598-019-42176-z.
39. Jensen M.A., Faruque S.M., Mekalanos J.J., Levin B.R. Modeling the role of bacteriophage in the control of cholera outbreaks // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103(12). – P. 4652–4657.
40. Jose D., Lekshmi N., Goel A.K. et al. Development of a novel herbal formulation to inhibit biofilm formation in toxigenic *Vibrio cholerae* // J. Food Prot. – 2017. – P. 1933–1940. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-17-091.
41. Kauffman R.C., Adekunle O., Yu H. et al. Impact of immunoglobulin isotype and epitope on the functional properties of *Vibrio cholerae* O-specific polysaccharide-specific monoclonal antibodies // mBio. – 2021. – Vol. 12(2) – e03679-20. doi: 10.1128/mBio.03679-20.
42. Kauffman R.C., Bhuiyan T.R., Nakajima R. et al. Single-cell analysis of the Plasmablast response to *Vibrio cholerae* demonstrates expansion of cross-reactive memory B cells // mBio. – 2016. – Vol. 7(6). – e02021-16. doi: 10.1128/mBio.02021-16.
43. Kaur S., Sharma P., Kalia N. et al. Anti-biofilm properties of the fecal probiotic *Lactobacilli* against *Vibrio* spp. // Front. Cell Infect. Microbiol. – 2018. – Vol. 8. – Art. 120. doi: 10.3389/fcimb.2018.00120.
44. Levinson K.J., Baranova D.E., Mantis N.J. A monoclonal antibody that targets the conserved core/lipid A region of lipopolysaccharide affects motility and reduces intestinal colonization of both classical and El Tor *Vibrio cholerae* biotypes // Vaccine. – 2016. – Vol. 34(48). – P. 5833–5836.
45. Lim A.N.W., Yen M., Seed K.D. et al. Tail fiber protein and a receptor-binding protein mediate ICP2 bacteriophage interactions with *Vibrio cholerae* OmpU // J. Bacteriol. – 2021. – Vol. 203(13). – e0014121. doi: 10.1128/JB.00141-21.
46. Maina A.N., Mwaura F.B., Jumba M. et al. Novel PhoH-encoding vibriophages with lytic activity against environmental *Vibrio* strains // Arch. Microbiol. – 2021. – Vol. 203(9). – P. 5321–5331.
47. Mohanraj R.S., Mandal J. Azithromycin can induce SOS response and horizontal gene transfer of SXT element in *Vibrio cholerae* // Mol. Biol. Rep. – 2022. – Vol. 49(6). – P. 4737–4748.
48. Mulangu S., Dodd L.E., Davey R.T.Jr. et al. A randomized, controlled trial of Ebola virus disease therapeutics // N. Engl. J. Med. – 2019. – Vol. 381(24). – P. 2293–2303.
49. Reyes-Robles T., Dillard R.S., Cairns L.S. et al. *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection // J. Bacteriol. – 2018. – Vol. 200(15). – e00792-17. doi: 10.1128/JB.00792-17.
50. Roth K.D.R., Wenzel E.V., Ruschig M. et al. Developing recombinant antibodies by phage display against infectious diseases and toxins for diagnostics and therapy // Front. Cell Infect. Microbiol. – 2021. – Vol. 11. – Art. 697876. doi: 10.3389/fcimb.2021.697876.
51. Sousa F.B.M., Nolêto I.R.S.G., Chaves L.S. et al. A comprehensive review of therapeutic approaches available for the treatment of cholera // J. Pharm. Pharmacol. – 2020. – Vol. 72(12). – P. 1715–1731.
52. Swope K., Morton J., Pogue G.P. et al. Reproducibility and flexibility of monoclonal antibody production with *Nicotiana benthamiana* // MAbs. – 2022. – Vol. 14(1). – Art. 2013594. doi: 10.1080/19420862.2021.2013594.
53. Tagousop C.N., Tamokou J.D., Ekom S.E. et al. Antimicrobial activities of flavonoid glycosides from *Graptophyllum grandulosum* and their mechanism of antibacterial action // BMC Complement Altern. Med. – 2018. – Vol. 18(1). – Art. 252. doi: 10.1186/s12906-018-2321-7.
54. Tahir U., Qamar M., Ahmad S. et al. Structural probing of HapR to identify potent phytochemicals to control *Vibrio cholerae* through integrated computational approaches // Comput. Biol. Med. – 2021. – Vol. 138. – Art. 104929. doi: 10.1016/j.combiomed.2021.104929.
55. Verma J., Bag S., Saha B. et al. Genomic plasticity associated with antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2019. – Vol. 116(13). – P. 6226–6231.
56. Yen M., Cairns L.S., Camilli A. A cocktail of three virulent bacteriophages prevents *Vibrio cholerae* infection in animal models // Nat. Commun. – 2017. – Vol. 8. – Art. 14187. doi: 10.1038/ncomms14187.
57. Yuan Xh., Li Ym., Vaziri A.Z. et al. Global status of antimicrobial resistance among environmental isolates of *Vibrio cholerae* O1/O139: a systematic review and meta-analysis //

Antimicrob. Resist. Infect. Control. — 2022. — Vol. 11(1). — Art. 62. doi: 10.1186/s13756-022-01100-3.

## References

- Akimkin VG, Darbeyeva OS, Kolkov VF. Bakteriofagi: istoricheskiye i sovremennyye aspekty ikh primeneniya: opyt i perspektivy. *Klinicheskaya praktika* 2010; 4(4):48–54 (in Russian).
- Andryukov BG, Zaporozhets TS, Besednova NN. Perspektivnyye strategii poiska novykh sredstv bor'by s infektsionnymi zabolevaniyami. *Antibiotiki i Khimioterapiya* 2018; 63(1–2):44–55 (in Russian).
- Bespalova IA, Ivanova IA, Omel'chenko ND i dr. Sovremennoye sostoyaniye spetsificheskoy profilaktiki kholery. *Epidemiologiya i vaksinooprofilaktika* 2018; 17(1):55–61.
- Gorshkova AS, Dryukker VV, Sykilinda NN. Sovmestnoye vozdeystviye bakteriofagov i antibiotika na bioplunku *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotiki i Khimioterapiya* 2020; 65(3–4):7–11.
- Goryayev AA, Sayapina LV, Obukhov YuI, Bondarev VP. Effektivnost' i bezopasnost' vaksiny dlya profilaktiki kholery. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lecheniye* 2018; 18(1):42–49.
- Danilov AI, Zharkova LP. Antibiotikorezistentnost': argumenty i fakty. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya* 2017; 26(5):6–9 (in Russian).
- Dykman LA. Tekhnologiya fagovogo displeya antitel. Bakteriofagi: teoreticheskiye i prakticheskiye aspekty primeneniya v meditsine, veterinarii i pishchevoy promyshlennosti: materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. Ul'yanovsk: UGSKHA im PA Stolygina, 2013; 2:109–114 (in Russian).
- Kruglikov VD. Razrabotka kriteriyev otbora probioticheskikh bakteriy dlya rasshireniya spektra dostupnykh protivokholernykh sredstv. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2012; 4(114):69–72 (in Russian).
- Markina OV, Maksimenko YeV, Markin NV i dr. Izucheniye sostava ekstraktov rasteniy, obladayushchikh antimikrobnym efektom v otnoshenii *Vibrio cholerae* El Tor, s pomoshch'yu vysokoeffektivnoy zhidkostnoy khromatografii. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* 2016; 1:63–66 (in Russian).
- Noskov AK, Kruglikov VD, Moskvitina EA i dr. Kholera: tendentsii razvitiya epidemicheskogo protsessa v 2021 g., prognoz na 2022 g. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2022; 1:24–34 (in Russian).
- Ovchinnikova MV, Abramova YeG, Kirillova TYu i dr. Antitoksicheskaya aktivnost' eksperimental'nogo protivokholernogo enterosorbtsionnogo preparata in vivo. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova* 2018; 14(4):48–53 (in Russian).
- Ovchinnikova MV, Islyayeva MN, Nikolayev VG i dr. Otsenka funktsional'noy aktivnosti spetsificheskogo protivokholernogo enterosorbenta. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2015; 2:83–86 (in Russian).
- Ovchinnikova MV, Korovkina GI, Zinina OS i dr. Liticheskiye i sorbtsionnyye svoystva eksperimental'noy smesi bakteriofag-khitozan. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova* 2019; 15(2):11–16 (in Russian).
- Onishchenko GG, Kutuyev VV, Shchukovskaya TN i dr. Spetsificheskaya profilaktika kholery v sovremennykh usloviyakh. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2011; 1(107):5–12 (in Russian).
- Pogozhova M.P., Gayevskaya N.Ye., Vodop'yanov A.S. i dr. Biologicheskiye svoystva i geneticheskaya kharakteristika eksperimental'nykh diagnosticheskikh bakteriofagov *Vibrio cholerae* // *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. — 2021. — T. 98. — № 3. — S. 290–297.
- Selyanskaya NA, Yegiazaryan LA, Yezhova MI i dr. Analiz ustoychivosti k antibakterial'nym preparatam kholernykh vibriov, vydelennykh iz ob'yektov okruzhayushchey sredy v Rossii v 2019 g. *Antibiotiki i khimioterapiya* 2021; 66(3–4):4–11.
- Smirnov VS, Totolyan AA. Nekotoryye vozmozhnosti immunoterapii pri koronavirusnoy infektsii. *Infektsiya i immunitet* 2020; 10(3):446–458 (in Russian).
- Tyurina AV, Gayevskaya NYe, Selyanskaya NA i dr. Aktivnost' preparata bakteriofagov v otnoshenii antibiotikorezistentnykh shtammov kholernykh vibriov El Tor. *Antibiotiki i Khimioterapiya* 2018; 63(7–8):29–32 (in Russian).
- Tyurina AV, Larionova LV, Filippenko AV i dr. Otsenka gumoral'nogo immunnogo otveta na vvedeniye kholernykh bakteriofagov u eksperimental'nykh zhivotnykh. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova* 2022; 18(2):36–41 (in Russian).
- Filippenko AV, Ivanova IA, Omel'chenko ND, Trufanova AA. Vliyaniye immunomodulyatorov na formirovaniye postvaksinal'nogo protivokholernogo immuniteta. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* 2022; 99(1):81–92 (in Russian).
- Filippenko AV, Omel'chenko ND, Pasyukova NI i dr. Sovershenstvovaniye spetsificheskoy profilaktiki kholery s pomoshch'yu immunomodulyatorov. *Meditsinskaya immunologiya* 2021; 23(4):915–920 (in Russian).
- Khaitov RM. Immunomodulyatory: mify i real'nost'. *Immunologiya* 2020; 41(2):101–106 (in Russian).
- Alamdary SZ, Bakhshi B. *Lactobacillus acidophilus* attenuates toxin production by *Vibrio cholerae* and shigella dysenteriae following intestinal epithelial cells infection. *Microb Pathog* 2020; 149:104543. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104543.
- Baranova DE, Chen L, Destrepes M et al. Passive immunity to *Vibrio cholerae* O1 afforded by a human monoclonal IgA1 antibody expressed in milk. *Pathogens and Immunity* 2020; 5(1):89–116.
- Baranova DE, Willsey GG, Levinson KJ et al. Transcriptional profiling of *Vibrio cholerae* O1 following exposure to human

- anti-lipopolysaccharide monoclonal antibodies. *Pathog Dis* 2020; 78(4):ftaa029. doi: 10.1093/femspd/ftaa029.
26. Barman RK, Chakrabarti A, Dutta S. Screening of potential *Vibrio cholerae* bacteriophages for cholera therapy: A comparative genomic approach. *Frontiers in Microbiology* 2022; 13:803933. doi: 10.3389/fmicb.2022.803933.
  27. Bhandare S, Colom J, Baig A et al. Reviving phage therapy for the treatment of cholera. *J Infect Dis* 2019; 219(5):786–794.
  28. Bhattacharya D, Sinha R, Mukherjee P et al. Anti-virulence activity of polyphenolic fraction isolated from Kombucha against *Vibrio cholerae*. *Microb Pathog* 2020; 140:103927. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103927.
  29. Bruns MM, Kakarla P, Floyd JT et al. Modulation of the multidrug efflux pump EmrD-3 from *Vibrio cholerae* by *Allium sativum* extract and the bioactive agent allyl sulfide plus synergistic enhancement of antimicrobial susceptibility by *A. sativum* extract. *Arch Microbiol* 2017; 199(8):1103–1112.
  30. Chen Q, Dharmaraj T, Cai PC et al. Bacteriophage and bacterial susceptibility, resistance, and tolerance to antibiotics. *Pharmaceutics* 2022; 14(7):1425. doi: 10.3390/pharmaceutics14071425.
  31. Cho JY, Liu R, Macbeth JC, Hsiao A. The interface of *Vibrio cholerae* and the gut microbiome. *Gut Microbes* 2021; 13(1):1937015. doi: 10.1080/19490976.2021.1937015.
  32. da Costa DS, Negreiros PDS, da Silva VG et al. Antidiarrheal activity of farnesol in rodents: Pharmacological actions and molecular docking. *Eur J Pharmacol* 2020; 874:172986. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.172986.
  33. Dey D, Quispe C, Hossain R et al. Ethnomedicinal use, phytochemistry, and pharmacology of *Xylocarpus granatum* J Koenig Evid Based Complement Alternat Med 2021; 2021:8922196. doi: 10.1155/2021/8922196.
  34. Dos Santos Negreiros P, da Costa DS, da Silva VG et al. Antidiarrheal activity of  $\alpha$ -terpineol in mice. *Biomed Pharmacother* 2019; 110:631–640.
  35. Ducarmon QR, Zwittink RD, Hornung BVH et al. Gut microbiota and colonization resistance against bacterial enteric infection. *Microbiol Mol Biol Rev* 2019; 83(3):e00007-19. doi: 10.1128/MMBR.00007-19.
  36. Ghosh AK, Panda SK, Luyten W. Anti-vibrio and immune-enhancing activity of medicinal plants in shrimp: A comprehensive review. *Fish Shellfish Immunol* 2021; 117:192–210.
  37. Habees AA, Aldabbas E, Bragazzi NL, Kong JD. Bacteria-bacteriophage cycles facilitate *Cholera* outbreak cycles: an indirect Susceptible-Infected-Recovered-Bacteria- Phage (iSIRBP) model-based mathematical study. *J Biol Dyn* 2022; 16(1):29–43.
  38. Howell CA, Mikhailovsky SV, Markaryan EN, Khovanov AV. Investigation of the adsorption capacity of the enterosorbent Enterogel for a range of bacterial toxins, bile acids and pharmaceutical drugs. *Sci Rep* 2019; 9(1):5629. doi: 10.1038/s41598-019-42176-z.
  39. Jensen MA, Faruque SM, Mekalanos JJ, Levin BR. Modeling the role of bacteriophage in the control of cholera outbreaks. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(12):4652–4657.
  40. Jose D, Lekshmi N, Goel AK et al. Development of a novel herbal formulation to inhibit biofilm formation in toxigenic *Vibrio cholerae*. *J Food Prot* 2017; 1933–1940. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-17-091.
  41. Kauffman RC, Adekunle O, Yu H et al. Impact of immunoglobulin isotype and epitope on the functional properties of *Vibrio cholerae* O-specific polysaccharide-specific monoclonal antibodies. *mBio* 2021; 12(2):e03679-20. doi: 10.1128/mBio.03679-20.
  42. Kauffman RC, Bhuiyan TR, Nakajima R et al. Single-cell analysis of the Plasmablast response to *Vibrio cholerae* demonstrates expansion of cross-reactive memory B cells. *mBio* 2016; 7(6):e02021-16. doi: 10.1128/mBio.02021-16.
  43. Kaur S, Sharma P, Kalia N et al. Anti-biofilm properties of the fecal probiotic *Lactobacilli* against *Vibrio* spp. *Front Cell Infect Microbiol* 2018; 8:120. doi: 10.3389/fcimb.2018.00120.
  44. Levinson KJ, Baranova DE, Mantis NJ. A monoclonal antibody that targets the conserved core/lipid A region of lipopolysaccharide affects motility and reduces intestinal colonization of both classical and El Tor *Vibrio cholerae* biotypes. *Vaccine* 2016; 34(48):5833–5836.
  45. Lim ANW, Yen M, Seed KD et al. Tail fiber protein and a receptor-binding protein mediate ICP2 bacteriophage interactions with *Vibrio cholerae* OmpU. *J Bacteriol* 2021; 203(13):e0014121. doi: 10.1128/JB.00141-21.
  46. Maina AN, Mwaura FB, Jumba M et al. Novel PhoH-encoding vibriophages with lytic activity against environmental *Vibrio* strains. *Arch Microbiol* 2021; 203(9):5321–5331.
  47. Mohanraj RS, Mandal J. Azithromycin can induce SOS response and horizontal gene transfer of SXT element in *Vibrio cholerae*. *Mol Biol Rep* 2022; 49(6):4737–4748.
  48. Mulangu S, Dodd LE, Davey RTJr et al. A randomized, controlled trial of Ebola virus disease therapeutics. *N Engl J Med* 2019; 381(24):2293–2303.
  49. Reyes-Robles T, Dillard RS, Cairns LS et al. *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection. *J Bacteriol* 2018; 200(15):e00792-17. doi: 10.1128/JB.00792-17.
  50. Roth KDR, Wenzel EV, Ruschig M et al. Developing recombinant antibodies by phage display against infectious diseases and toxins for diagnostics and therapy. *Front Cell Infect Microbiol* 2021; 11:697876. doi: 10.3389/fcimb.2021.697876.
  51. Sousa FBM, Nolêto IRSG, Chaves LS et al. A comprehensive review of therapeutic approaches available for the treatment of cholera. *J Pharm Pharmacol* 2020; 72(12):1715–1731.
  52. Swope K, Morton J, Pogue GP et al. Reproducibility and flexibility of monoclonal antibody production with *Nicotiana benthamiana*. *MAbs* 2022; 14(1):2013594. doi: 10.1080/19420862.2021.2013594.
  53. Tagousop CN, Tamokou JD, Ekom SE et al. Antimicrobial activities of flavonoid glycosides from *Graptophyllum granulatum* and their mechanism of antibacterial action. *BMC*

- Complement Altern Med 2018; 18(1):252. doi: 10.1186/s12906-018-2321-7.
54. Tahir U, Qamar M, Ahmad S et al. Structural probing of HapR to identify potent phytochemicals to control *Vibrio cholerae* through integrated computational approaches. Comput Biol Med 2021; 138:104929. doi: 10.1016/j.compbiomed.2021.104929.
55. Verma J, Bag S, Saha B et al. Genomic plasticity associated with antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae*. Proc Natl Acad Sci USA 2019; 116(13):6226–6231.
56. Yen M, Cairns LS, Camilli A. A cocktail of three virulent bacteriophages prevents *Vibrio cholerae* infection in animal models. Nat Commun 2017; 8:14187. doi: 10.1038/ncomms14187.
57. Yuan Xh, Li Ym, Vaziri AZ et al. Global status of antimicrobial resistance among environmental isolates of *Vibrio cholerae* O1/O139: a systematic review and meta-analysis. Antimicrob Resist Infect Control 2022; 11(1):62. doi: 10.1186/s13756-022-01100-3.

## EFFECTIVE MEANS IN THE FIGHT AGAINST *CHOLERA* IN THE ERA OF ANTIBIOTIC RESISTANCE

O.F. KRETENCHUK, M.V. POLEEVA, V.A. KORSHENKO,  
E.I. MARKOVSKAYA, O.S. CHEMISOVA

*Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don*

The review presents literature data on effective means of combating cholera in the era of antibiotic resistance, including the use of modern technologies. Bacteriophage therapy is considered one of the alternatives to antibiotic treatment. Monoclonal antibodies that bind the pathogen or its products in the intestinal lumen have also proven themselves well. Effective prevention and treatment measures include the activation of the immune system, which has significant capabilities in the formation of protective reactions. Of particular interest is the use of medicinal plants, probiotics and sorbents. Taking into account the information available to date, the problem of finding new effective means of combating cholera remains relevant and requires a coordinated and multisectoral approach.

*Keywords:* cholera, antibiotic resistance, bacteriophages, monoclonal antibodies, probiotics, sorbents, extracts of medicinal plants, immunomodulators, biofilms, binary drugs.

### Address:

Kretenchuk O.F., Ph.D.  
senior researcher of the department of scientific  
and educational support of the Rostov-on-Don Anti-Plague  
Institute of Rosпотребнадзор.  
e-mail: kretenchuk\_of@antiplague.ru

### Для цитирования:

Кретенчук О.Ф., Полеева М.В., Коршенко В.А., Марковская Е.И., Чемисова О.С. Эффективные средства в борьбе с холерой в эпоху антибиотикорезистентности. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(4):72–82.

### For citation:

Kretenchuk O.F., Poleeva M.V., Korshenko V.A., Markovskaya E.I., Chemisova O.S. Effective means in the fight against *Cholera* in the era of antibiotic resistance. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(4):72–82 (in Russian).

## СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЯМИ РОДА *SALMONELLA* (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

С.А. ИВАНОВ, Д.И. СИМАКОВА\*, И.Р. СИМОНОВА, А.В. ЕВТЕЕВ, Н.Е. ГАЕВСКАЯ

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

Представлен обзор современных методов лабораторной диагностики возбудителей острых кишечных инфекций, вызываемых представителями рода *Salmonella*. Описаны принципы работы, достоинства и недостатки основных методов исследования (бактериологический, серологические, молекулярно-генетические, масс-спектрометрические, спектроскопические). Показана актуальность развития различных направлений в диагностике сальмонеллезной инфекции.

**Ключевые слова:** сальмонеллез, острые кишечные инфекции, методы исследования, лабораторная диагностика, обзоры.

По оценке ВОЗ, острыми кишечными инфекциями (ОКИ) ежегодно заболевает 550 миллионов человек, в том числе 220 миллионов детей моложе 5 лет. *Salmonella* является одной из четырех основных причин диарейных болезней во всем мире [30].

Сальмонеллез — острая зоонозная кишечная инфекция, характеризующаяся поражением органов пищеварения с развитием синдрома интоксикации и водно-электролитных нарушений, реже — с тифоподобным или септикопиемическим течением. Сальмонеллез вызывает 3 миллиона смертей во всем мире ежегодно. В 2019 году было зарегистрировано около 1,2 миллиона случаев нетипичного сальмонеллеза, в 2018 г. — 19000 случаев госпитализации, из них 370 с летальным исходом; при этом 11% из них обусловлены непосредственным контактом с животными [15].

В Российской Федерации показатель заболеваемости сальмонеллезом занимает третье место (после ОКИ вирусной этиологии) в структуре очагов групповой заболеваемости с фекально-оральным механизмом передачи инфекции. Величина экономического ущерба, нанесенного в 2020 году ОКИ установленного и неустановленного генеза на территории России, составила 12 млрд. рублей, из них ущерб от ОКИ с установленным

генезом составил 2,3 млрд. рублей [11]. Экономический ущерб от заболевания сальмонеллезом в 2019 г. составил около 2,3 млрд. руб. [10].

Заболеваемость сальмонеллезом носит спорадический характер, но также регистрируются крупные пищевые, реже водные вспышки, очаги нозокомальной инфекции и вспышки в закрытых учреждениях. Для Российской Федерации характерна общая тенденция к снижению показателя заболеваемости сальмонеллезом. В 2020 г. по сравнению с 2019 г. показатель уменьшился в 1,6 раза и составил 14,71 на 100 тыс. населения. В этиологической структуре преобладают заболевания, вызванные сальмонеллами группы D (77,4%). Вместе с тем сальмонеллез сохраняет свою актуальность при формировании вспышечной заболеваемости и занимает третье место в структуре очагов групповой заболеваемости с фекально-оральным механизмом передачи инфекции. За 2020 год было зарегистрировано 20 очагов групповой заболеваемости данной инфекцией с общим количеством заболевших 422 человека. Основные выделяемые возбудители — *S. enteritidis* и *S. infantis* [11]. Наиболее высокая заболеваемость сальмонеллезом характерна для детей дошкольного возраста. Источником инфекции при сальмонеллезе являются животные и человек (больные и бактерионосители), причем большую опасность представляют животные бактериовыделители. Заболеваемость регистрируется в течение всего года, с подъемом в летне-осеннее время. Основной путь распространения инфекции — пищевой, причем ведущим фактором передачи являются инфицированные продукты птицеводства: мясо кур, индеек, водоплавающих птиц и яйца. Меньшую эпидемиологическую значимость име-

© 2022 г. Иванов С.А., Симакова Д.И., Симонова И.Р., Евтеев А.В., Гаевская Н.Е.

\* Автор для переписки:

Симакова Диана Игоревна

к.б.н., и.о. зав. лабораторией диагностических препаратов Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора

E-mail: simakova\_di@antiplague.ru

ют свинина, говядина. Доказано, что резервуаром того или иного серотипа сальмонелл служат определенные животные. Значительно реже инфекция передается водным и контактно-бытовым путем, который характерен для госпитальных штаммов сальмонелл, несущих множественные плазмиды антибиотикорезистентности: на первом месте — *S. typhimurium* вариант *kopengagen*, на втором — *S. haifa*; для этих штаммов дискутируется и возможность воздушно-пылевого пути передачи [3].

Род *Salmonella* входит в семейство *Enterobacteriaceae* и состоит из микроорганизмов, родственных по фенотипическим и генотипическим свойствам. Согласно последним данным, род *Salmonella* представлен двумя видами (на основании строения ДНК): *S. enterica* с пятью подвидами (в каждом из которых множество серотипов в зависимости от наличия О- и Н-антигенов) и *S. bongori* (включает в себя менее 10 очень редких сероваров). Сальмонеллы вида *enterica* делятся на шесть подвидов, которые имеют определенное эпидемиологическое значение, так как основным естественным резервуаром сальмонелл подвидов 1 и 2 служат теплокровные животные, а для представителей остальных подвидов 3–6 — хладнокровные животные и окружающая среда. В настоящее время насчитывается более 2579 серологических вариантов сальмонелл (основанных на схеме Кауфмана — Уайта, 2007 г., 9-е издание). Однако практическое значение имеют 10–15 серотипов, которые обуславливают до 90% заболеваемости в мире. К ним относятся: *S. enteritidis* (*S. enterica*), *S. typhimurium*, *S. derby*, *S. newport*, *S. heidelberg*, *S. panama*, *S. london*, *S. infantis*, *S. anatum*. Сальмонеллы имеют три основных антигена: О-соматический (термостабильный), Н-жгутиковый (термолабильный) и К-поверхностный (капсульный). По общности соматического О-антигена сальмонеллы подразделяются на 5 основных групп, обозначаемых заглавными буквами латинского алфавита: А, В, С, D и Е. Кроме того, у некоторых сероваров сальмонелл описаны и другие антигены: Vi-антиген, или антиген «вирулентности» (один из компонентов О-антигена), и М-антиген (слизистый).

За последние 20 лет во всем мире и в России широко распространилась *S. enteritidis*. Представители этого серовара вызывают пищевые вспышки сальмонеллеза при низкой дозе указанных микроорганизмов в продукте, а заболевания отличаются, как правило, более манифестным клиническим течением [6]. Патогенность сальмонелл кодируют хромосомные гены, которые образуют пять «островков патогенности» (*Salmonella Pathogenicity Islands*, SPI: SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4,

SPI-5). Продукты секреции плазмидных генов способствуют внекишечному диссеминации сальмонелл.

Лабораторная диагностика сальмонеллезной инфекции представлена широким спектром различных методов для выявления и идентификации представителей рода *Salmonella* в пробах из объектов окружающей среды, от больных и лиц, подозрительных на заболеваемость. В настоящий момент на территории Российской Федерации диагностика сальмонеллеза регламентируется следующими нормативными документами: МУ 4.2.2723-10, а также Межгосударственным стандартом ГОСТ 31659-2012 (ISO 6579:2002) [4, 7]. Так, в основе лабораторной диагностики сальмонеллезов лежит выделение и идентификация *Salmonella spp.* с помощью питательных сред и биохимических тестов, определение уровня антител в сыворотке крови в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) и детекция ДНК возбудителя с помощью ПЦР [9, 12, 14].

«Золотым стандартом» в диагностике сальмонеллезов является выделение чистой культуры микроорганизма, что позволяет получить полную информацию о его фенотипических свойствах, включая чувствительность к антибиотикам. Средняя длительность исследования составляет от 3 до 4 дней. Недостатками метода являются: длительность исследования, зависимость от качества диагностических сред и предшествующая анализу антибиотикотерапия.

Для сокращения времени исследования были разработаны флуорогенные и хромогенные питательные среды (например, агар Рамбаха, SM-ID агар и BBL CHROM-agar) [14], миниатюрные формы биохимического анализа для быстрого подтверждения видовой принадлежности выделенных микроорганизмов [27], автоматизация процесса лабораторных исследований. Примером такого комплексного подхода является использование набора для биохимической идентификации «API 20E» и автоматизированной системы идентификации микроорганизмов «BioLog» [34]. Все эти изменения значительно сокращают время исследования, объемы необходимых реагентов, сред и аппаратуры по сравнению с обычным биохимическим анализом.

По данным литературы, существуют различные методы выявления представителей рода *Salmonella* из объектов внешней среды и от человека, направленные как на выявление антигенов и антител (IgM, IgG), так и на обнаружение специфических целевых последовательностей ДНК/кДНК, рибосомной РНК [23, 25, 31, 37, 39].

Так, к серологическим методам относятся иммуноферментный анализ (ИФА), метод латексной агглютинации и ИХА анализ, которые основаны на образовании специфического комплекса «антиген-антитело» [8]. Метод ИФА является высокочувствительным и высокоспецифичным для качественного и количественного определения различных веществ, обладающих свойствами антигена, гаптена (неполноценного антигена) или антитела. Метод широко используется для диагностики инфекционных и неинфекционных заболеваний человека и животных [22, 29]. Показания к использованию ИФА при заражении человека представителями рода *Salmonella* следующие: подтверждение клинического диагноза при получении отрицательного результата бактериологического обследования; ретроспективное подтверждение диагноза. Метод также применяется в качестве вспомогательного теста при диагностике ОКИ (после 1 недели заболевания и далее в динамике через неделю); при позднем обращении больного, назначении антибактериальной терапии; при затяжном течении заболевания; при оценке источника инфекции [3]. Для диагностики сальмонеллеза наибольшее распространение получили гетерогенные методы ИФА, основанные на использовании полистирольных планшетов для иммобилизации антител или антигенов, специфическом связывании определяемого вещества на стенках лунок планшета и последующем выявлении образовавшихся иммунокомплексов с помощью меченных ферментами компонентов. Иммуноферментный анализ по сравнению с другими методами детекции антигенов и антител обладает следующими преимуществами — высокой чувствительностью, позволяющей выявлять концентрации до 0,05 нг/мл; стабильностью при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА; простотой проведения реакции; наличием как инструментального, так и визуального учета; возможностью автоматизации всех этапов реакции и относительно низкой стоимостью диагностических наборов. Благодаря своей невысокой стоимости, чувствительности и специфичности ИФА перешел в разряд стандартных, «рутинных» методов. Так, для определения сальмонелл в пищевых продуктах методом ИФА по ГОСТ Р 54354-2011 используются тест-система «LOCATE *Salmonella*», тест-система «RIDASCREEN *Salmonella*» для определения сальмонелл в пищевых продуктах, животных кормах и пробах окружающей среды. ИФА-тест для определения антител к Vi-антигену возбудителя брюшного тифа используется для выявления бактерионосителей, в том числе среди работников пищевых предприятий и с целью оценки эффективности вакцинации против брюшного тифа.

Метод латексной агглютинации относится к самым простым методам выявления сальмонелл. В его основу положено использование сенсibilизированных антигенами или антителами частиц полистирольного латекса, которые в присутствии гомологичного реагента склеиваются. Время проведения данной реакции составляет 3–8 мин, что позволяет применять ее в качестве экспресс-метода для выявления антигенов и антител. Объектами исследования могут быть сыворотка крови, фекалии и другие доступные объекты, содержащие антигены или антитела. Присутствие сальмонелл в исследуемой пробе приводит к визуализированной латексной агглютинации, поскольку антигены возбудителя реагируют с иммобилизованными на поверхности латекса антителами [26, 41]. Тест-система «SPECTATE(R) *Salmonella*», предназначенная для серологического анализа сальмонелл в культуральных бульонах и из выделенных чистых культур методом латексной агглютинации, позволяет быстро дифференцировать их принадлежность к основным серологическим группам. Преимущества этого метода заключаются в том, что частицы латекса, в отличие от эритроцитов, не имеют перекрестно реагирующих антигенов, что делает его специфичнее других аналогичных методов (например, РНГА).

Одним из серологических методов диагностики сальмонеллезной инфекции служит иммунохроматографический анализ (ИХА), который основан на реакции между антигеном и соответствующим ему антителом. Вместе с анализируемой жидкостью под действием капиллярных сил вдоль ИХА-полоски перемещаются и антитела с красителем. Если в жидкости присутствует искомым антиген, то происходит его связывание с конъюгатом «моноклональные антитела — краситель» (антителами), жестко иммобилизованными в тест-зоне ИХА-полоски, что проявляется в виде яркой окрашенной полосы. Свободные антитела с красителем мигрируют далее вдоль полоски и неизбежно взаимодействуют с анти-Ig в контрольной зоне, где и наблюдается вторая окрашенная (контрольная) полоса [5]. Привлекательность данного метода связана с быстротой проведения анализа, простотой и экономичностью. Однако чувствительность метода составляет от 20 нг/мл до 1 мкг/мл,  $1 \times 10^6$ – $1 \times 10^7$  м.к./мл, что представляется существенным минусом. Как пример уже созданных иммунохроматографических тест-систем можно привести набор российского производства — «Тест иммунохроматографический для выявления *Salmonella spp.* в кале», предназначенный для *in vitro* одноэтапного быстрого качественного выявления *Salmonella enteritidis* и *Salmonella typhimurium*

(*Salmonella* spp.) в кале. Иностраный аналог данного теста — это «Singlepath® *Salmonella*», то есть экспресс-тест на сальмонеллы, Германия (Merck KGaA). Время получения результата при использовании данного теста составляет 20 минут, специфичность тестов — 99%.

Также в работе Скопинской С.Н. с соавт. [13] приводятся данные о создании диагностической тест-системы на основе ИХА и наночастиц гексацианферрата железа для повышения чувствительности метода при выявлении представителей рода *Salmonella*.

К молекулярно-генетическим методам, направленным на диагностику сальмонеллезной инфекции, относятся: полимеразная цепная реакция (ПЦР) [25], петлевая изотермическая амплификация (LAMP) [39], амплификация на основе последовательности нуклеиновых кислот (NASBA), рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA) [37], ДНК-микрочипы, секвенирование полного генома (WGS) [31]. Благодаря прогрессу за последние два десятилетия серологический и молекулярный методы исследования стали наиболее быстро развивающимися аналитическими методами [16, 33, 34]. В основе принципа работы молекулярно-генетических методов лежит гибридизация коротких олигонуклеотидных фрагментов (зонд или праймер) для выявления специфических целевых последовательностей ДНК/кДНК [1]. Метод характеризуется высокими чувствительностью и специфичностью.

Метод ПЦР основан на принципе комплементарности и многократном увеличении количества целевого фрагмента ДНК/кДНК на этапе амплификации в присутствии термостабильных полимераз, что, в свою очередь, позволяет обнаружить специфическую молекулу ДНК [1]. Данный метод достаточно широко применяется для выявления сальмонелл и других возбудителей ОКИ в различных пробах из окружающей среды и от человека [32]. ПЦР в «реальном времени» (RT-ПЦР) дает возможность проведения мониторинга кинетики накопления ампликонов во время проведения реакции ПЦР, что достигается с помощью добавления в реакционную смесь интеркалирующих красителей, способных встраиваться в двухцепочечные молекулы ДНК или модифицированные дезоксирибонуклеотиды, которые флуоресцируют после гибридизации со специфическими фрагментами ДНК [46]. Как разновидность этого метода можно выделить мультиплексную ПЦР, позволяющую обнаруживать несколько специфических фрагментов ДНК/кДНК искомого микроорганизма [17, 45]. Parker A.M. et al (2020) в своей работе использовали гены инвазии (*invA*) и тетрационат-редуктазы (*ttr*) в качестве целевых фрагментов при идентификации сальмонелл. Однако по

мере развития метода были найдены новые целевые гены, такие как ген энтеротоксина *Salmonella* (*stn*), ген порина F наружной мембраны (*ompF*), локус гиперинвазии A (*hilA*), ген плазмиды вирулентности (*spvC*) и многие другие, обеспечивающие высокую чувствительность и специфичность метода [40]. Мультиплексная ПЦР, определяющая наличие нескольких генов одновременно, используется для оценки безопасности пищевых продуктов [24]. Арсенал ПЦР тест-систем, применяемых при диагностике заболеваний, вызываемых представителями рода *Salmonella*, широко представлен на российском рынке: наборы реагентов «Kylt® *Salmonella* spp.» для обнаружения *Salmonella* spp. методом ПЦР в пищевых продуктах и образцах окружающей среды, «АмплиСенс® *Shigella* spp. и EIEC/*Salmonella* spp./*Campylobacter* spp.-FL» — в объектах окружающей среды и клиническом материале методом ПЦР» и др.

Несмотря на то, что ПЦР считается одним из основных методов лабораторной диагностики, метод не лишен ряда недостатков, в частности, присутствие ионов железа, этанола, изопропанола и ряда других веществ могут ингибировать реакцию или значительно снижать ее чувствительность. Кроме того, контаминация продуктами амплификации рабочих поверхностей может привести к ложноположительным результатам [24].

Альтернативой методам на основе ПЦР как в клинических лабораториях, так и при тестировании безопасности пищевых продуктов служит петлевая изотермическая амплификация (LAMP). При проведении LAMP используется ДНК-полимераза (*Bst*) и набор из четырех праймеров, которые могут распознавать шесть различных целевых областей ДНК [36]. В отличие от ПЦР, метод LAMP позволяет провести исследование значительно быстрее, специфичнее. Данный метод широко используется для обнаружения сальмонелл [36, 37]. В работе Liu N. et al. [35] приводится описание набора реагентов на основе мультиплексного LAMP для обнаружения *Salmonella* spp. и *Vibrio parahaemolyticus* со 100%-ной специфичностью, а также набора реагентов для количественного определения *S. enteritidis* в режиме реального времени. Этот метод обладает недостатками, свойственными всем молекулярно-генетическим методам, в частности, ПЦР.

Одним из методов изотермической амплификации является метод NASBA, мишенью в котором служит молекула РНК. Использование при диагностике бактериальных инфекций рибосомной РНК может давать некоторые преимущества: количество копий рибосомной РНК может составлять от нескольких сотен до нескольких десятков

тысяч на клетку, обеспечивая даже при минимальной концентрации бактериальных клеток в пробе достаточно высокую концентрацию мишеней для амплификации. Учитывая, что РНК гораздо менее стабильный по сравнению с ДНК материал и результаты диагностики на основе NASBA позволяют обнаруживать живые микроорганизмы в образце, данный метод может более адекватно отражать эффективность проводимой антибактериальной терапии [48]. По данным литературы, метод NASBA признан достаточно перспективным методом при обнаружении бактерии рода *Salmonella* в исследуемых образцах [35].

Метод рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA) относится к группе методов, основанных на изотермической технологии амплификации и детекции ДНК, который дает возможность амплифицировать ДНК в течение 30 мин при постоянной температуре 37–42 °С путем моделирования *in vivo* рекомбинации ДНК. Этот метод был использован для амплификации различных мишеней, включая РНК и ДНК, из широкого спектра организмов и образцов. В RPA используют большой фрагмент *Bsu*-полимеразы (ДНК-полимеразы *Bacillus subtilis*), SSB-белки *gp32* фага T4, его же рекомбиназу *UvsX*, а также два противоположных праймера, подобно ПЦР. Часть молекул рекомбиназы связывают с одним праймером, часть — с другим. После внесения в реакционную смесь такие молекулы сканируют ДНК в поисках комплементарных праймеру участков и, найдя их, иницируют процесс расплетения двухцепочечной молекулы и присоединения праймера. Расплетенную ДНК стабилизируют SSB-белки, а полимеразы начинают синтез (процесс АТФ-зависимый, поскольку энергия нужна для освобождения 3'-конца праймера от молекул рекомбиназы). Размер амплифицируемого фрагмента ограничивается тысячей пар нуклеотидов, а минимальная длина праймера должна быть 30 нуклеотидов для повышения его специфичности [37]. Метод на основе RPA был апробирован для обнаружения представителей рода *Salmonella* в образцах пищи [21, 43, 48].

В настоящее время разработан молекулярно-генетический метод (ДНК-микрочипы), основанный на параллельной гибридизации от десятков до тысяч специфических и селективных ДНК-зондов с их соответствующей целевой ДНК на одном чипе, то есть в одном исследовании [20]. Первоначально этот метод использовался для изучения анализа экспрессии генов, но его применение получило широкое распространение для использования в сравнительной геномике, анализе последовательностей и диагностике. В работе Guo D. et al. [28] описана разработанная система ДНК-микрочипа

для выявления *S. enterica*, которая в эксперименте обнаруживает и идентифицирует 40 серогрупп вида *Salmonella* из образцов искусственно контаминированной пищи. Этот метод высоко специфичен, идентифицирует 98% штаммов *Salmonella* в образце с другими близкородственными видами бактерий. Однако для проведения исследований данный метод достаточно дорогостоящий и требует высокой квалификации специалистов.

Полногеномное секвенирование (WGS) входит в состав высокоавтоматизированных и наукоемких методов. С его помощью можно выявлять детальные характеристики возбудителей сальмонеллеза, а также изучать такие особенности генома, как факторы патогенности и механизмы регуляции экспрессии генов. WGS-метод используется для определения степени генетического родства возбудителей инфекций, выделенных из различных источников при расследовании вспышек и sporadических пищевых отравлений. С помощью полногеномного анализа разработаны принципиально новые алгоритмы расследования вспышек инфекционных заболеваний, вызванных сальмонеллой, созданы сетевые системы ранней диагностики и оповещения [2]. В отличие от ДНК-микрочипов, которые нацелены на определенные гены, WGS работает путем секвенирования целых фрагментов бактериальной ДНК, собирая их в полную геномную последовательность [44, 48]. Данный метод трудоемок, финансово затратный и требует высокой квалификации на этапах сборки и анализа собранного генома.

Для проведения научно-исследовательских работ при углубленном изучении возбудителя сальмонеллеза могут использоваться методы на основе масс-спектрометрии — времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF-MS), жидкостная хромато-масс-спектрометрия (LC-MS) [38], спектроскопические методы — рамановская спектроскопия [47], спектроскопия в ближней инфракрасной области (NIRS) [42] и гиперспектральная визуализация (HSI) [19]. Также в литературе приводятся данные об использовании электрохимических биосенсоров [18].

Несмотря на то, что мировая статистика заболеваемости сальмонеллезом постепенно снижается, необходимо дальнейшее развитие и оптимизация существующих методов исследования для более эффективной диагностики и проведения эпидемиологических исследований при возникновении sporadических и/или групповых случаев заболевания ОКИ.

Необходимо отметить, что в диагностике сальмонеллезной инфекции в РФ представлен не весь спектр существующих методов исследований. На сегодняшний

день производится достаточно большое количество наборов реагентов, направленных на обнаружение и дифференциацию сальмонелл, большая часть которых относится к молекулярно-генетическим и микробиологическим методам исследований. Среди серологических исследований нашли широкое применение методы ИХА, ИФА, тесты латексной слайд-агглютинации импортного производства, предназначенные для выявления сальмонелл в пищевых продуктах, кормах для животных и пробах из окружающей среды. Согласно МУ 4.2.2723-10, для исследования проб от больных в качестве вспомогательного теста рекомендовано использование реакции пассивной гемагглютинации (РПГА). Общеизвестная нестабильность эритроцитов в качестве носителя диктует необходимость создания диагностикумов на основе полимерных микросфер со стандартными физико-химическими свойствами. Реакция латексной слайд-агглютинации обладает высокой специфичностью, не требует приборного оснащения, проста в исполнении и учете результата реакции. Представляется также актуальным создание простого экономичного и доступного практическим лабораториям диагностикума для серологической диагностики сальмонеллеза.

## Литература

1. Гильмирова Ф.Н., Колотьева Н.А., Гусякова О.А., Сидорова И.Ф. Полимеразная цепная реакция. История открытия. Новый этап развития // Ремедиум Поволжье. — 2017. — № 4(154). — С. 17–21.
2. Ефимочкина Н.Р., Шевелева С.А. Перспективные молекулярно-генетические методы секвенирования микроорганизмов в системе оценки и контроля биобезопасности пищевой продукции // Вопросы питания. — 2022. — № 1(539). — С. 37–52.
3. Клинические рекомендации (протокол лечения) оказания медицинской помощи детям больным сальмонеллезом. ФГБУ НИИДИ ФМБА России. Принят и введен в действие: Утвержден на заседании Профильной комиссии 9 октября 2013 г.
4. Лабораторная диагностика сальмонеллезом, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды. МУ 4.2.2723-10. — М., 2010 г.
5. Малышев В.В., Змеева Т.А., Сбойчаков В.Б. Инновации в полевой микробиологии / Материалы Российск. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы инфекционной патологии», 1–3 марта, СПб. Приложение № 1 к журналу «Журнал инфектологии». — 2017. — Т. 9. — № 1. — С. 95–96.
6. Медицинская микробиология / Гл. ред. В.И. Покровский, О.К. Поздеев. — М.: ГЭОТАР Медицина, 1999. — 1200 с.
7. Метод выявления бактерий рода *Salmonella* Food products. Method for the detection of *Salmonella* spp. ГОСТ 31659-2012 (ISO 6579:2002). — М., 2013 г.
8. Метод иммуноферментного анализа. ОФС.1.7.2.0033.15. Общественная фармакопейная статья. МЗ РФ. <https://pharmacopeia.ru/ofs-1-7-2-0033-15-metod-immunofermentnogo-analiza>.
9. Методические рекомендации «Серологическая диагностика острых кишечных инфекций методом РПГА (шигеллеза, сальмонеллеза и брюшного тифа)». МР 4.2.0249-21 // Бюллетень нормативных и методических документов Госсанэпиднадзора. — 2021. — № 2(84). — 16 с.
10. Михеева М.А., Михеева И.В. Динамика рейтинга экономического ущерба от инфекционных болезней как критерий эффективности эпидемиологического контроля // Журнал микробиологии, эпидемиологии и эпидемиологии. — 2020. — № 97(2). — С. 174–181.
11. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 г.: государственный доклад. — М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021. — 256 с.
12. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. СанПиН 3.3686-21. — М., 2021.
13. Скопинская С.Н., Ярков С.П., Храмов Е.Н. Создание диагностических тест-систем на основе иммунохроматографии и наночастиц гексацианферрата (II) железа (III) // Медицина экстремальных ситуаций. — 2013. — № 2(44). — С. 76-85.
14. Abdelhaseib M.U., Singh A.K., Bhunia A.K. Simultaneous detection of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in food using a light scattering sensor // J. Appl. Microbiol. — 2019. — Vol. 126(5). — P. 1496–1507.
15. Anamaria M.P., Dos Santos, Ferrari R.G., Conte-Junior C.A. Virulence factors in *Salmonella typhimurium*: The sagacity of a bacterium // Curr. Microbiol. — 2019. — Vol. 76(6). — P. 762–773.
16. Awang M.S., Bustami Y., Hamzah H.H., Zambry N.S., Najib M.A., Khalid M.F., Aziah I., Manaf A.A. Advancement in *Salmonella* detection methods: From conventional to electrochemical-based sensing detection // Biosensors. — 2021. — Vol. 11(9). — P. 346.
17. Azinheiro S., Carvalho J., Prado M., Garrido-Maestu A. Multiplex detection of *Salmonella* spp., *E. coli* O157 and *L. monocytogenes* by qPCR melt curve analysis in spiked infant formula // Microorganisms. — 2020. — Vol. 8(9). — P. 1359. doi: 10.3390/microorganisms8091359.
18. Bell R.L., Jarvis K.G., Ottesen A.R., McFarland M.A., Brown E.W. Recent and emerging innovations in *Salmonella* detection: A food and environmental perspective // Microb. Biotechnol. — 2016. — Vol. 9(3). — P. 279–292.
19. Bonah E., Huang X., Aheto J.H., Osae R. Application of hyperspectral imaging as a nondestructive technique for food-

- borne pathogen detection and characterization // *Foodborne Pathog. Dis.* – 2019. – Vol. 16(10). – P. 712–722.
20. Chen J., Liu X., Chen J., Guo Z., Wang Y., Chen G., Chen X., Yan Q., Yang P., Li R. Development of a rapid test method for *Salmonella enterica* detection based on fluorescence probe-based recombinase polymerase amplification // *Food Anal. Methods.* – 2019. – Vol. 12. – P. 1791–1798.
  21. Dao T.N.T., Lee E.Y., Koo B., Jin C.E., Lee T.Y., Shin Y. A microfluidic enrichment platform with a recombinase polymerase amplification sensor for pathogen diagnosis // *Anal. Biochem.* – 2018. – Vol. 544. – P. 87–92.
  22. Di Febo T., Schirone M., Visciano P., Portanti O., Armillotta G., Persiani T., Di Giannatale E., Tittarelli M., Luciani M. Development of a capture ELISA for rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples // *Food Analytical Methods.* – 2019. – Vol. 12. – P. 322–330.
  23. Dilek Ç.A.M. Lateral flow assay for *Salmonella* detection and potential reagents / *New Insight into Brucella Infection and Foodborne Diseases.* – IntechOpen: London, UK, 2019. – 156 p.
  24. Dmitric M., Vidanovic D., Matovic K., Sekler M., Saric L., Arsic M., Karabasil N. In-house validation of real-time PCR methods for detecting the INV A and TTR genes of *Salmonella* spp. in food // *J. Food Process. Preserv.* – 2018. – Vol. 42 (3). – E13455. doi: 10.1111/jfpp.13455.
  25. Fenollar F., Raoult D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms // *APMIS.* – 2004. – Vol. 112(11–12). – P. 785–807.
  26. Ferone M., Gowen A., Fanning S., Scannell A.G.M. Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* – 2020. – Vol. 19(6). – P. 3106–3129.
  27. Gast R.K., Porter R.E., Jr. *Salmonella Infections / Diseases of Poultry.* 14<sup>th</sup> ed., John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2020. – P. 717–753.
  28. Guo D., Liu B., Liu F., Cao B., Chen M., Hao X., Feng L., Wang L. Development of a DNA microarray for molecular identification of all 46 *Salmonella* O serogroups // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2013. – Vol. 79(11). – P. 3392–3399.
  29. He Y., Ren Y., Guo B., Yang Y., Ji Y., Zhang D., Wang J., Wang Y., Wang H. Development of a specific nanobody and its application in rapid and selective determination of *Salmonella enteritidis* in milk // *Food Chemistry.* – 2020. – Vol. 310. – 125942. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125942.
  30. [https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)).
  31. Ibrahim G.M., Morin P.M. *Salmonella* serotyping using whole genome sequencing // *Front. Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – Art. 2993. doi: 10.3389/fmicb.2018.02993.
  32. Kang J., Kim M.-G. Advancements in DNA-assisted Immunosensors // *BioChip J.* – 2020. – Vol. 14. – P. 18–31.
  33. Khosravi M., Gharibi D., Moradi N., Ghorbanpoor M. Evaluation of a rapid enzyme immunoassay test for diagnosis of contamination of milk, water and feces to *Salmonella typhimurium* // *Vet. Arhiv.* – 2020. – Vol. 90(5). – P. 509-516.
  34. Lin L., Zheng Q., Lin J., Yuk H.-G., Guo L. Immuno- and nucleic acid-based current technique for *Salmonella* detection in food // *Eur. Food Res. Technol.* – 2020. – Vol. 246. – P. 373–395.
  35. Liu N., Zou D., Dong D., Yang Z., Ao D., Liu W., Huang L. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification method for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Vibrio parahaemolyticus* // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – Art. 45601. doi: 10.1038/srep45601.
  36. Li Y., Fan P., Zhou S., Zhang L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens // *Microb. Pathog.* – 2017. – Vol. 107. – P. 54–61.
  37. Lobato I.M., O’Sullivan C.K. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances // *Trends Anal. Chem.* – 2018. – Vol. 98. – P. 19–35.
  38. Mangmee S., Reamtong O., Kalambaheti T., Roytrakul S., Sonthayanon P. MALDI-TOF mass spectrometry typing for predominant serovars of non-typhoidal *Salmonella* in a Thai broiler industry // *Food Control.* – 2020. – Vol. 113. – Art. 107188. doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107188.
  39. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – Vol. 28(12). – E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
  40. Parker A.M., Mohler V.L., Gunn A.A., House J.K. Development of a qPCR for the detection and quantification of *Salmonella* spp. in sheep feces and tissues // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2020. – Vol. 32(6). – P. 835–843.
  41. Peng H., Huang Z., Wu W., Liu M., Huang K., Yang Y., Deng H., Xia X., Chen W. Versatile High-Performance Electrochemiluminescence ELISA platform based on a gold nanocluster probe // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2019. – Vol. 11(27). – P. 24812–24819.
  42. Pereira J.M., Leme L., Perdoncini M.R.F.G., Valderrama P., Março P.H. Fast discrimination of milk contaminated with *Salmonella* spp. via near-infrared spectroscopy // *Food Anal. Methods.* – 2018. – Vol. 11(7). – P. 1878–1885.
  43. Ren J., Man Y., Li A., Liang G., Jin X., Pan L. Detection of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in foods using a rapid, multiplex real-time recombinase polymerase amplification assay // *J. food safety.* – 2020. – Vol. 40(3). – E12784. doi: 10.1111/jfs.12784.
  44. Ronholm J. Editorial: game changer – next generation sequencing and its impact on food microbiology // *Front. Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – Art. 363. doi: 10.3389/fmicb.2018.00363.
  45. Ruan J., Wang W., Zhang T., Zheng T., Zheng J., Yu S., Yu D., Huang Y. Establishment of a duplex real-time qPCR method for detection of *Salmonella* spp. and *Serratia fonticola*

in fishmeal // *AMB Express*. — 2020. — Vol. 10. — Art. 207. doi: 10.1186/s13568-020-01144-x.

46. Vinayaka A.C., Ngo T.A., Kant K., Engelsmann P., Dave V.P., Shahbazi M.-A., Wolff A., Bang D.D. Rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples by a novel approach with combination of sample concentration and direct PCR // *Biosens. Bioelectron.* — 2019. — Vol. 129. — P. 224–230.
  47. Zhao X., Li M., Xu Z. Detection of foodborne pathogens by surface enhanced raman spectroscopy // *Front. Microbiol.* — 2018. — Vol. 9. — Art. 1236. doi: 10.3389/fmicb.2018.01236.
  48. Zhao Y., Jiang X., Qu Y., Pan R., Pang X., Jiang Y., Man C. *Salmonella* detection in powdered dairy products using a novel molecular tool // *J. Dairy Sci.* — 2017. — Vol. 100(5). — P. 3480–3496.
- References**
1. Gil'mirova FN, Kolot'yeva NA, Gusyakova OA, Sidorova IF. Polimeraznaya tsepnaya reaktsiya. Istoriya otkrytiya. Novyy etap razvitiya. *Remedium Povolzh'ye* 2017; 4(154):17–21 (in Russian).
  2. Yefimochkina NR, Sheveleva SA. Perspektivnyye molekulyarno-geneticheskiye metody sekvenirovaniya mikroorganizmov v sisteme otsenki i kontrolya biobezopasnosti pishchevoy produktsii. *Voprosy pitaniya* 2022; 1(539):37–52 (in Russian).
  3. Klinicheskiye rekomendatsii (protokol lecheniya) okazaniya meditsinskoy pomoshchi detyam bol'nym sal'monellezom. FGBU NIIDI FMBA Rossii. Prinyat i vveden v deystviye: Utverzhden na zasedanii Profil'noy komissii 9 oktyabrya 2013 g (in Russian).
  4. Laboratornaya diagnostika sal'monellezov, obnaruzheniye sal'monell v pishchevykh produktakh i ob'yektakh okruzhayushchey sredy. MU 4.2.2723-10. Moscow, 2010 (in Russian).
  5. Malyshev VV, Zmeyeva TA, Sboychakov VB. Innovatsii v polevoy mikrobiologii. Materialy Rossiysk. nauch.-prakt. konf. «Aktual'nyye problemy infektsionnoy patologii», 1–3 marta, SPb. Prilozheniye № 1 k zhurnal «Zhurnal infektologii» 2017; 9(1):95–96 (in Russian).
  6. Meditsinskaya mikrobiologiya. Gl red VI Pokrovskiy, OK Pozdeyev. Moscow: GEOTAR Meditsina, 1999: 1200 (in Russian).
  7. Metod vyyavleniya bakteriy roda *Salmonella* Food products. Method for the detection of *Salmonella* spp. GOST 31659-2012 (ISO 6579:2002). Moscow, 2013 (in Russian).
  8. Metod immunofermentnogo analiza. OFS.1.7.2.0033.15. Obshchaya farmakopeynaya stat'ya. MZ RF. <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0033-15-metod-immunofermentnogo-analiza> (in Russian).
  9. Metodicheskiye rekomendatsii «Serologicheskaya diagnostika ostrykh kishhechnykh infektsiy metodom RPGA (shigelleza, sal'monelleza i bryushnogo tifa)». MR 4.2.0249-21. Byulleten' normativnykh i metodicheskikh dokumentov Gossanepidnadzora 2021; 2(84): 16 (in Russian).
  10. Mikheyeva MA, Mikheyeva IV. Dinamika reytinga ekonomicheskogo ushcherba ot infektsionnykh bolezney kak kriteriy effektivnosti epidemiologicheskogo kontrolya. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i epidemiologii* 2020; 97(2):174–181 (in Russian).
  11. O sostoyanii sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya v Rossiyskoy Federatsii v 2020 g.: gosudarstvennyy doklad. Moscow: Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitel'ey i blagopoluchiya cheloveka, 2021: 256 (in Russian).
  12. Sanitarno-epidemiologicheskkiye trebovaniya po profilaktike infektsionnykh bolezney. SanPiN 3.3686-21. Moscow, 2021 (in Russian).
  13. Skopinskaya SN, Yarkov SP, Khramov YeN. Sozdaniye diagnostichekikh test-sistem na osnove immunokhromatografii i nanochastits gekzatsianferrata (II) zheleza (III) / *Meditsina ekstremal'nykh situatsiy* 2013; 2(44):76-85 (in Russian).
  14. Abdelhaseib MU, Singh AK, Bhunia AK Simultaneous detection of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in food using a light scattering sensor. *J Appl Microbio* 2019; 126(5):1496–1507
  15. Anamaria MP Dos Santos, Ferrari RG, Conte-Junior CA. Virulence factors in *Salmonella typhimurium*: The sagacity of a bacterium. *Curr Microbiol* 2019; 76(6):762–773.
  16. Awang MS, Bustami Y, Hamzah HH, Zambry NS, Najib MA, Khalid MF, Aziah I, Manaf AA. Advancement in *Salmonella* detection methods: From conventional to electrochemical-based sensing detection. *Biosensors* 2021; 11(9):346.
  17. Azinheiro S., Carvalho J., Prado M., Garrido-Maestu A. Multiplex detection of *Salmonella* spp., *E. coli* O157 and *L. monocytogenes* by qPCR melt curve analysis in spiked infant formula. *Microorganisms* 2020; 8(9):1359. doi: 10.3390/microorganisms8091359.
  18. Bell RL, Jarvis KG, Ottesen AR, McFarland MA, Brown EW. Recent and emerging innovations in *Salmonella* detection: A food and environmental perspective. *Microb Biotechnol* 2016; 9(3):279–292.
  19. Bonah E, Huang X, Aheto JH, Osaie R. Application of hyperspectral imaging as a nondestructive technique for foodborne pathogen detection and characterization. *Foodborne Pathog Dis* 2019; 16(10):712–722.
  20. Chen J, Liu X, Chen J, Guo Z, Wang Y, Chen G, Chen X, Yan Q, Yang P, Li R. Development of a rapid test method for *Salmonella enterica* detection based on fluorescence probe-based recombinase polymerase amplification. *Food Anal Methods* 2019; 12:1791–1798.
  21. Dao TNT, Lee EY, Koo B, Jin CE, Lee TY, Shin Y. A microfluidic enrichment platform with a recombinase polymerase

- amplification sensor for pathogen diagnosis. *Anal Biochem* 2018; 544:87–92.
22. Di Febo T, Schirone M, Visciano P, Portanti O, Armillotta G, Persiani T, Di Giannatale E, Tittarelli M, Luciani M. Development of a capture ELISA for rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples. *Food Analytical Methods* 2019; 12:322–330.
  23. Dilek ÇAM. Lateral flow assay for *Salmonella* detection and potential reagents. *New Insight into Brucella Infection and Foodborne Diseases*. IntechOpen: London, UK, 2019: 156.
  24. Dmitric M, Vidanovic D, Matovic K, Sekler M, Saric L, Arsic M, Karabasil N. In-house validation of real-time PCR methods for detecting the INV A and TTR genes of *Salmonella* spp. in food. *J Food Process Preserv* 2018; 42(3): E13455. doi: 10.1111/jfpp.13455.
  25. Fenollar F, Raoult D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *APMIS* 2004; 112(11–12):785 – 807.
  26. Ferone M, Gowen A, Fanning S, Scannell AGM. Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2020; 19(6):3106–3129.
  27. Gast RK, Porter RE, Jr. *Salmonella* Infections. Diseases of Poultry. 14<sup>th</sup> ed, John Wiley & Sons Inc: Hoboken, NJ, USA, 2020:717–753.
  28. Guo D, Liu B, Liu F, Cao B, Chen M, Hao X, Feng L, Wang L. Development of a DNA microarray for molecular identification of all 46 *Salmonella* O serogroups. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79(11):3392–3399.
  29. He Y, Ren Y, Guo B, Yang Y, Ji Y, Zhang D, Wang J, Wang Y, Wang H. Development of a specific nanobody and its application in rapid and selective determination of *Salmonella enteritidis* in milk. *Food Chemistry* 2020; 310:1259;2. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125942.
  30. [https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)).
  31. Ibrahim GM, Morin PM. *Salmonella* serotyping using whole genome sequencing. *Front Microbiol* 2018; 9:2993. doi: 10.3389/fmicb.2018.02993.
  32. Kang J, Kim M-G. Advancements in DNA-assisted Immunosensors. *BioChip J* 2020; 14:18–31.
  33. Khosravi M, Gharibi D, Moradi N, Ghorbanpoor M. Evaluation of a rapid enzyme immunoassay test for diagnosis of contamination of milk, water and feces to *Salmonella typhimurium*. *Vet Arhiv* 2020; 90(5):509-516.
  34. Lin L, Zheng Q, Lin J, Yuk H-G, Guo L. Immuno- and nucleic acid-based current technique for *Salmonella* detection in food. *Eur Food Res Technol* 2020; 246:373–395.
  35. Liu N, Zou D, Dong D, Yang Z, Ao D, Liu W, Huang L. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification method for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Vibrio parahaemolyticus*. *Sci Rep* 2017; 7:45601. doi: 10.1038/srep45601.
  36. Li Y, Fan P, Zhou S, Zhang L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. *Microb Pathog* 2017; 107:54–61.
  37. Lobato IM, O’Sullivan CK. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *Trends Anal Chem* 2018; 98:19–35.
  38. Mangmee S, Reamtong O, Kalambaheti T, Roytrakul S, Sonthayanon P. MALDI-TOF mass spectrometry typing for predominant serovars of non-typhoidal *Salmonella* in a Thai broiler industry. *Food Control* 2020; 113:107188. doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107188.
  39. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(12): E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
  40. Parker AM, Mohler VL, Gunn AA, House JK. Development of a qPCR for the detection and quantification of *Salmonella* spp. in sheep feces and tissues. *J Vet Diagn Invest* 2020; 32(6):835–843.
  41. Peng H, Huang Z, Wu W, Liu M, Huang K, Yang Y, Deng H, Xia X, Chen W. Versatile High-Performance Electrochemiluminescence ELISA platform based on a gold nanocluster probe. *ACS Appl Mater Interfaces* 2019; 11(27):24812–24819.
  42. Pereira JM, Leme L, Perdoncini MRFG, Valderrama P, Março PH. Fast discrimination of milk contaminated with *Salmonella* spp. via near-infrared spectroscopy. *Food Anal Methods* 2018; 11(7):1878–1885.
  43. Ren J, Man Y, Li A, Liang G, Jin X, Pan L. Detection of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in foods using a rapid, multiplex real-time recombinase polymerase amplification assay. *J. food safety* 2020; 40(3):E12784. doi: 10.1111/jfs.12784.
  44. Ronholm J. Editorial: game changer – next generation sequencing and its impact on food microbiology. *Front Microbiol* 2018; 9:363. doi: 10.3389/fmicb.2018.00363.
  45. Ruan J, Wang W, Zhang T, Zheng T, Zheng J, Yu S, Yu D, Huang Y. Establishment of a duplex real-time qPCR method for detection of *Salmonella* spp. and *Serratia fonticola* in fishmeal. *AMB Express* 2020; 10:207. doi: 10.1186/s13568-020-01144-x.
  46. Vinayaka AC, Ngo TA, Kant K, Engelsmann P, Dave VP, Shahbazi M-A, Wolff A, Bang DD. Rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples by a novel approach with combination of sample concentration and direct PCR. *Biosens Bioelectron* 2019; 129:224–230.
  47. Zhao X, Li M, Xu Z. Detection of foodborne pathogens by surface enhanced raman spectroscopy. *Front Microbiol* 2018; 9:1236. doi: 10.3389/fmicb.2018.01236.
  48. Zhao Y, Jiang X, Qu Y, Pan R, Pang X, Jiang Y, Man C. *Salmonella* detection in powdered dairy products using a novel molecular tool. *J Dairy Sci* 2017; 100(5):3480–3496.

## MODERN ASPECTS OF LABORATORY DIAGNOSIS OF ACUTE INTESTINAL INFECTIONS, CAUSED BY REPRESENTATIVES OF THE GENUS *SALMONELLA* (LITERATURE REVIEW)

S.A. IVANOV, D.I. SIMAKOVA, I.R. SIMONOVA, A.V. EVTEEV, N.E. GAEVSKAYA

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

A review of modern methods of laboratory diagnostics of causative agents of acute intestinal infections caused by representatives of the genus *Salmonella* is presented. The principles of operation, advantages and disadvantages of the main research methods (bacteriological, serological, molecular genetic, mass spectrometric, spectroscopic) are described. The relevance of the development of various directions in the diagnosis of *Salmonella* infection is shown.

*Keywords:* salmonellosis, acute intestinal infections, research methods, laboratory diagnostics, reviews.

### **Address:**

Simakova D.I., Ph.D.

acting head of the laboratory of diagnostic preparations  
of the Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute  
of Rospotrebnadzor

E-mail: simakova\_di@antiplague.ru

### **Для цитирования:**

Иванов С.А., Симакова Д.И., Симонова И.Р., Евтеев А.В., Гаевская Н.Е. Современные аспекты лабораторной диагностики острых кишечных инфекций, вызванных представителями рода *Salmonella* (обзор литературы). Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(4):83–92.

### **For citation:**

Ivanov S.A., Simakova D.I., Simonova I.R., Evteev A.V., Gaevskaya N.E. Modern aspects of laboratory diagnosis of acute intestinal infections, caused by representatives of the genus *Salmonella* (literature review). Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(4):83–92 (in Russian).

# МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К КОНТРОЛЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ СИСТЕМ ОЧИСТКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ АЭРОЗОЛЕЙ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

А.В. КОМИССАРОВ<sup>1\*</sup>, О.А. ВОЛОХ<sup>1</sup>, К.М. МОРОЗОВ<sup>1</sup>, А.К. НИКИФОРОВ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»,

<sup>2</sup> Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, Саратов

В ряде биотехнологических процессов, в особенности в производстве вакцин, применяются микроорганизмы различной патогенности. При протекании процессов неизбежно образуются биоаэрозоли, что предъявляет повышенные требования к надежности работы систем очистки от них. Неизбежно возникает необходимость их контроля. Поэтому главной задачей обзорной статьи являлись изучение и анализ данных нормативных документов, научной периодики и патентов на изобретения, раскрывающих методические подходы к контролю эффективности систем очистки биологических аэрозолей при протекании биотехнологических процессов и, в первую очередь, для применения в процедуре культивирования микроорганизмов в биореакторах. Рассмотрены аспекты применения биологических и физико-химических методов испытаний на эффективность работы систем очистки биологических аэрозолей, а также фильтров на задерживающую способность. Выявлены их преимущества и недостатки. Показана перспективность применения физических методов испытаний с использованием в качестве тестирующих аэрозолей субстанций небактериального характера в силу того, что они позволяют практически в режиме реального времени давать заключение о защитной эффективности фильтра. Представленные данные дают возможность принять во внимание отрицательные и положительные моменты изложенных в статье решений о методических подходах к контролю эффективности систем очистки биологических аэрозолей в биотехнологических процессах при их выборе.

**Ключевые слова:** биотехнологические процессы, контроль эффективности систем очистки от биологических аэрозолей, биологические и физико-химические методы, обзоры.

## Введение

В ряде биотехнологических процессов, в том числе на стадии культивирования в биореакторах, где неизбежно образуется биоаэрозоль, применяются микроорганизмы различной патогенности. В качестве примера можно привести производство таких зарегистрированных в Российской Федерации иммунобиологических лекарственных препаратов, как чумная, сибиреязвенная, холерная и ряд других вакцин. Для обеззараживания биоаэрозоля используются различные инженерные системы, эффективность функционирования которых подлежит обязательному контролю. Это определяет актуальность анализа литературных сведений по методическим подходам к контролю эффективности работы систем очистки

биологических аэрозолей в биотехнологических процессах. Следует отметить, что представленный материал является дополнением к обзору литературы диссертации одного из авторов статьи А.В. Комиссарова (диссертация, 2016).

## Основная часть

*Биологические методы испытания фильтров.* В нормативном документе, определяющем требования биологической безопасности при глубинном аппаратном культивировании микроорганизмов I–II групп патогенности (Методические указания МУ 1.3.2411-08) предложена следующая методика проверки биологической безопасности установки, предназначенной для выращивания микроорганизмов I–II групп патогенности, осуществляемой раз в полгода. Дополнительно в состав установки включается сосуд со стерильной жидкой питательной средой, размещенный перед финишным стерилизующим фильтром. Далее осуществляют выращивание *Serratia marcescens* как тестирующего микроба. После завершения выращивания емкость с бульоном отсоединяют и

© 2022 г. Комиссаров А.В., Волох О.А., Морозов К.М., Никифоров А.К.

\* Автор для переписки:

Комиссаров Александр Владимирович

д.б.н., ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

E-mail: komissarov-9@yandex.ru

инкубируют в течение суток при 28 °С. По окончании инкубации содержимое бульона высевают на плотную питательную среду, которую выдерживают при тех же температурно-временных параметрах и далее в течение суток при температуре 20 °С. Если зафиксировано отсутствие роста *S. marcescens*, то это дает право использовать установку для выращивания микроорганизмов I–II групп патогенности. Данный метод был применен при разработке системы защиты окружающей среды от бактериальных аэрозолей в установках для культивирования микроорганизмов [13]. Между тем культивирование какого-либо микроорганизма, за исключением его производственных штаммов, в биореакторах, используемых в технологиях приготовления вакцин, порождает определенные опасения в правомочности этой процедуры. Правила, регламентирующие основные положения по безопасной работе с микроорганизмами I–II групп патогенности (Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней СанПиН 3.3686-21), указывают на необходимость перед установкой на место эксплуатации контроля пригодности для применения фильтров биоаэрозолям, содержащим  $10^5$ – $10^9$  м.к./см<sup>3</sup> микробов *Escherichia coli* или *S. marcescens*. Также разрешено применение других способов. При этом после монтажа необходимо проведение процедуры определения коэффициента проницаемости масляным туманом.

Имеются сведения об использовании биоаэрозоля *S. marcescens* для контроля задерживающей способности газовых фильтров в 48 ЦНИИ Минобороны РФ [2] и РосНИИПЧИ «Микроб» [3]. В коллективной монографии приводятся данные о применении *Bacteria prodigiosum* с концентрацией до 106 клеток/мл в качестве тест-аэрозоля для проверки фильтров [11].

Ряд авторов заявлял об удачном применении аэрозоля бактерий *Pseudomonas diminuta* при контроле задержания микроорганизмов воздушной микрофлоры воздушными фильтрами, используемыми для стерилизующей фильтрации воздуха, подаваемого на аэрирование микробных культур в ферментерах [25, 31]. Исследователями выявлена применимость *P. diminuta* с содержанием  $10^7$  м.к./см<sup>3</sup> в биоаэрозоле при контроле целостности микрофильтрационных фильтров Dugarone [35].

T. Venezech в качестве тестирующего аэрозоля в стендовых испытаниях микрофильтрационных элементов (порог отсечки — 0,2 мкм) применял бактерии *Brevundimonas diminuta* и спорообразующий микроб *Bacillus subtilis*. Коэффициент проскока фильтров составлял порядка 99,9995% при применении этих микроорганизмов [19]. В коллективной монографии

есть сведения о применении при проверке фильтров спор микроорганизмов *Bacillus subtilis*, бактериофагов и пигментных энтеробактерий *Bacterium prodigiosum* [3].

Исследователями выявлена возможность применения *S. marcescens* и бактериофага MS2 в качестве тестирующих биоаэрозолей при контроле коэффициента проскока газовых фильтрующих элементов, который для неповрежденных фильтров в обоих случаях был определен больше 99,99% [28]. В статье приводятся данные о возможности использования для проверки фильтров *Bacillus subtilis* и фагов [43]. Правомочность использования бактериофагов в оборудовании, задействованном для производства иммунобиологических препаратов, в особенности лечебных, вряд ли является обоснованной.

На рубеже 70–80-х гг. XX столетия во Всероссийском НИИ автоматики (ВНИИА) сконструирован агрегат для проверки газовых фильтров тонкой очистки микробным аэрозолям. При этом биоаэрозолям служил *Staphylococcus aureus*. Использование золотистого стафилококка авторы мотивировали его стабильностью при распылении, так как он относится к воздушной микрофлоре [9]. Однако целесообразность использования патогенного возбудителя вызывает определенные сомнения.

К.Н. Брюсов с соавт. заявили о применимости контроля на проскок газовых стерилизующих фильтров микробным аэрозолям, содержащим инактивированные клетки *E. coli*. Методика заключается в следующем. Живые клетки *E. coli* красят диарилметановым основным красителем, далее полученный раствор подвергают инактивации, а затем фиксации 1,0% формальдегидом. После распыления полученного аэрозоля и отбора проб считают клетки, дающие флуоресценцию. Исследователи заявляют об увеличении чувствительности примененных методических приемов, так как окрашиваются и мертвые микробы [5]. Имеются сведения о методических приемах контроля эффективности работы системы очистки воздуха, отводимого из биореактора, заключающихся в отборе проб воздуха с последующим высевом на питательные среды [12].

Всем вышеперечисленным биологическим методам испытаний фильтров также присущ следующий отрицательный момент — продолжительный период времени (до 3 суток) от начала испытаний до получения результата о пригодности/непригодности фильтров, связанный с необходимостью выращивания отобранных проб на питательных средах.

Заслуживает определенного внимания предложенный исследователями [1] способ проверки эффективности задержания микробных токсинов фильтрами

тонкой очистки, который характеризуется применением в качестве тестирующего аэрозоля препарата микробных (*Erwinia herbicola* и *Pseudomonas fluorescens*) белков, состоящего из агломератов молекулярной массой порядка 150 кДа. Используется способность инициации данным препаратом образования льда. Определение льдообразующей способности определяется по присутствию в образце точек зародышеобразования льда переохлажденной воды, образуемых специфическими белками. В основу численного выявления точек зародышеобразования льда в образцах положена методика, заключающаяся в выявлении количества замерзающих микрокапель анализируемых образцов при оптимальной температуре исследования (минус 7–11 °С), а также применении известной зависимости содержания точек зародышеобразования льда от количества кристаллизующихся микрокапель.

Разработанному способу, по нашему мнению, присущи следующие недостатки: трудность, а также существенная продолжительность до получения результата о возможности использования фильтров.

*Физико-химические методы испытания фильтров.* Микроорганизмы позволительно отнести к физическим частицам, обладающим конкретными размерами. Исходя из этого, задачу их устранения из биоаэрозоля представляется возможным определить как удаление твердых микрочастиц. По всей видимости, поэтому нормативные правила как нашей страны, так и иностранные предполагают, в том числе, применение физико-химических методов испытания фильтров.

В России проверка фильтров классов HEPA и ULPA проводится согласно ГОСТ Р ИСО 14644-3-2007. Этот документ аналогичен нормативному документу международной организации по стандартизации ISO 14644-3:2005 и предлагает ряд материалов для создания тестирующих аэрозолей: микрочастицы термopластичного полимера вестирона, ряд синтетических и минеральных масел, диоктиловый эфир себаценовой кислоты, ди-втор-октиловый эфир себаценовой кислоты, ди-втор-октиловый эфир фталевой кислоты. ГОСТ оговаривает следующие процедуры контроля удерживающей способности фильтров: при применении фотометрического анализатора, а также измерителя количества аэрозольных частиц. Методика с использованием фотометра предполагает измерение массы частиц в объеме пробы. Ей присуще существенно большее содержание частиц в контрольном аэрозоле в сравнении с применением измерителя количества частиц. Данное обстоятельство вызывает засорение фильтров [6].

Другой нормативный документ, ГОСТ Р ЕН 1822-2-2012, определяет, что для испытаний фильтров допустимыми жидкими веществами, применяемыми с целью создания аэрозолей, являются: диэтиловый эфир себаценовой кислоты; синтетические и минеральные масла небольшой вязкости. Однако возможно использование иных материалов с приемлемыми свойствами. Кроме того, допускается применение аэрозолей, содержащих твердые частицы, например, термopластичный полимер вестирон. Контроль задерживающей способности осуществляется по измерителю количества аэрозольных частиц. Этот ГОСТ аналогичен нормативному документу Европейской организации по стандартизации EN 1822-2:2009.

Германские правила DIN 24185-2-1980 «Method of testing air filters used in general ventilation; filter classification, marking, test» представляют частично измененную версию документа американского общества инженеров по отоплению, охлаждению и кондиционированию воздуха ASHRAE 52-76 «Method of testing air cleaning devices used in general ventilation for removing particulate matter method of testing air cleaning devices used in general ventilation for removing particulate matter» и предлагают проверку фильтров с применением частиц, содержащихся в воздушной среде помещений, а также синтетических микрочастиц. Методика проверки предусматривает применение весового метода. Второй немецкий документ — DIN 24184-1990 «Type testing of high efficiency particulate air filters; using paraffin oil mist as test aerosol» — определяет порядок испытаний фильтров и предполагает использование аэрозоля парафинового масла. Для контроля применяется измеритель количества аэрозольных частиц.

Документ VDI 3926 Blatt 1 / Part 1 «Testing of cleanable filter media. Standard test for the evaluation of cleanable filter media» предполагает контроль фильтров аэрозолем кварцевых микрочастиц (от 0,2 до 2,0 микрон) с содержанием от 180 до 220 мг/м<sup>3</sup>. Скорость движения газа при проведении процедуры составляет  $3 \cdot 10^{-2}$  м/с. Для контроля используется гравиметрический метод [18].

Вышеназванные правила создавались с целью проверки фильтров, установленных в системах отвода загрязненного воздуха из помещений. В связи с этим представлялось уместным подвергнуть анализу и иные существующие приемы контроля удерживающей способности фильтров.

Компании, выпускающие невпитывающие влагу мембранные фильтры, проводят контроль невредимости,

как правило, способами, предполагающими применение смачивающей жидкости:

- испытание по снижению давления заполненного жидкостью фильтра в течение установленного временного интервала;

- контроль по «точке пузырька» предполагает постепенное увеличение давления в заполненном жидкостью фильтре. Если величина давления при появлении жидкости на выходе из фильтра превышает установленную, то фильтр бракуется;

- при водно-интрузионном испытании проводится подача в пространство мембранного элемента жидкости и воздуха под давлением. Определяется количество жидкости, попавшей в поры мембранного элемента. При недостижении количества жидкости установленной величины фильтр признается годным [24].

По нашему мнению, использование жидкости нецелесообразно, так как возникает потребность последующего удаления влаги со стерилизующих фильтров, что вызывает неудобства при испытаниях мембранных устройств, установленных на место эксплуатации.

На наш взгляд, актуально рассмотреть применимость физико-химических методов испытаний фильтров по сведениям из литературных источников. Исследователи, контролируя удерживающую способность фильтров с порогом отсечки 0,1–0,2 микрон, использовали в качестве контрольного аэрозоля раствора натриевой и цинковой солей соляной кислоты [33]. Японскими исследователями для проверки фильтров чистых помещений показана возможность применения уранилового люминофора. В качестве преимущества декларируется избирательность регистрации с помощью высокочувствительного флуоресцентного метода [17]. При испытании респираторов фильтрующего типа исследователями в качестве тест-аэрозоля применялся 2% водный раствор хлорида натрия, распыляемый форсунками [22, 29].

В патенте РФ № 2443996 описана методика испытания фильтра, установленного на место эксплуатации, с применением в качестве контрольного аэрозоля частиц диоктилового эфира о-фталевой кислоты с размером от 0,3 до 0,5 микрон. Концентрация частиц до испытываемого элемента должна составлять как минимум  $10^7/\text{м}^3$ . Величину защитной эффективности определяют выражением (1):

$$E = 100 - \frac{n_2}{n_1} \times 100\%, \quad (1)$$

где  $E$  — вычисленная защитная эффективность;  $n_1$  и  $n_2$  — содержание частиц диоктилового эфира о-фталевой кислоты в  $1 \text{ м}^3$  воздуха до и после испытываемого элемента. Фильтр признается годным, если значение вычисленной защитной эффективности превышает 99,995%. Изобретатели декларируют увеличение информативности, облегчение процедуры и уменьшение времени на испытания фильтров [2].

Исследователями выявлена возможность испытания без использования генерирующих аэрозоль устройств, применяя пылевые частицы воздуха помещения [34]. Такие же выводы были сделаны в диссертационном исследовании А.В. Кушкина (автореферат диссертации, 2000) при обосновании методики испытания металлокерамического фильтра. Данный способ применяется на Уральском электрохимическом комбинате, при этом специалисты в качестве метода сравнения применяли испытания фильтров по бактериальному аэрозолю *S. marcescens*.

Исследователи при проведении экспериментов по возможности использования аэрозоля раствора натриевой соли соляной кислоты с целью контроля удерживающей способности газовых фильтров использовали диоктиловый эфир о-фталевой кислоты и краситель метиленовый голубой. Выявлена допустимость употребления всех примененных веществ [30].

Имеются сведения о проверке невпитывающих влагу фторопластовых фильтров Emflon (порог отсечки 0,2 микрона) бактериальными и бактериофаговыми аэрозолями. Испытывались мембранные элементы, проверенные производителем (американская компания «Палл») аэрозолем раствора натриевой соли соляной кислоты и диоктилового эфира о-фталевой кислоты. Показана допустимость применения всех использованных способов испытаний [23]. Группой исследователей выявлена идентичность итогов контроля удерживающей способности невпитывающих влагу фторопластовых фильтров (порог отсечки 0,2 микрона), производимых немецкой компанией «Сарториус» при применении аэрозолей бактериофага MS2 и диоктилового эфира о-фталевой кислоты [42]. Между тем причисление диоктилового эфира о-фталевой кислоты ко второму классу опасности вызывает опасения по целесообразности его использования.

Основным применяемым методом получения аэрозольных частиц, по мнению W.C. Hinds, является распыление жидких растворов или суспензий. Рабочее давление форсунок сжатого воздуха обычно находится в диапазоне от 100 до нескольких сотен кПа. Применяются, в основном, следующие жидкости: ди-втор-октиловый эфир фталевой кислоты, ди-втор-октиловый эфир себациновой

кислоты, олеиновая кислота, минеральные и силиконовые масла. Отмечается, что размер частиц аэрозоля остается стабильным в течение сотен секунд [27].

Имеются сведения об использовании метода испарения и конденсации с помощью высокотемпературного нагрева для получения металлических наночастиц, особенно в диапазоне ниже 30 нм, в качестве тест-аэрозоля [21, 32, 38, 39, 41]. При этом авторы подчеркивают, что наиболее часто используется серебро из-за его стабильности на воздухе и относительно низкой температуры плавления. J. Wang a. P. Tronville утверждают, что метод испарения и конденсации с помощью высокотемпературного нагрева и метод распыления тест-аэрозоля могут генерировать достаточно частиц в диапазоне от 15 до 30 нм для фильтрационных испытаний [45].

Рядом исследователей анонсируется метод генерации наночастиц (углерода и меди), применяемых в качестве тест-аэрозоля, искровым разрядом [20, 26, 37, 44]. Этот метод использует периодический искровой разряд для испарения электродных материалов и последующей нуклеации/конденсации с образованием наночастиц [40]. Коммерческие генераторы искры доступны на рынке [45].

Проведенными исследованиями в ГНЦ ВБ «Вектор» выявлена возможность тестирования целостности воздушных фильтров аэрозолем минерального масла марок Т22 и Т30, не прекращая эксплуатацию вентиляционных систем. Экспериментаторами показана идентичность характеристик защитной эффективности фильтров как при генерировании масел, так и диоктилового эфира о-фталевой кислоты [7, 42]. Между тем многократное использование масла способно вызывать замасливание очищающих элементов и, как следствие этого, приводить к уменьшению производительности систем вентиляции.

В 48 ЦНИИ Минобороны РФ, кроме *S. marcescens*, для создания тестирующего аэрозоля при контроле удерживающей способности фильтров очистки воздуха применяется краситель флуоресцеин [9]. Между тем применение красителя приводит к оседанию его частиц на фильтре и необходимости учета фонового содержания флуоресцеина в дальнейших проверках [1].

K.W. Lee a. B.Y.H. Liu при экспериментальном исследовании фильтрации аэрозоля волокнистыми фильтрами [36] применяли диоктилфталат, растворенный в летучем растворителе (например, этиловый спирт). Для избавления от нежелательных электростатических эффектов, электрические заряды на аэрозолях нейтрализовывались путем воздействия на них облаком биполярных ионов, создаваемых радиоактивным источником. В авторском свидетельстве на изобретение показана

возможность применения дистиллированной воды или этилового спирта с необходимым количеством частиц полистирольного латекса, диспергируемых с помощью генератора аэрозоля, работающего от сжатого воздуха [4].

В РосНИПЧИ «Микроб» с целью контроля удерживающей способности фильтров НЕРА, кроме использования биоаэрозоля *S. marcescens*, применяется тестирующий аэрозоль диэтилового эфира себадиновой кислоты. Исследователи декларируют о возможности определения целесообразности эксплуатации фильтра спустя 0,25 ч после определения результатов измерений по счетчику дискретных аэрозольных частиц [7]. В этом же учреждении внедрена в практику «метод, реализованный за счет того, что при работающем генераторе аэрозоля подавали тестовый аэрозоль диэтилгексилсебацината в атмосферу помещения, затем при работающем компрессоре определяли концентрации тестового аэрозоля с диаметром аэрозольных частиц 0,3 мкм в точках пробоотбора, расположенных перед и после фильтра тонкой очистки, вычисляли значение фактической защитной эффективности фильтра тонкой очистки, как процентное отношение разности концентрации частиц до и после фильтра к концентрации частиц до фильтра» [10]. Данный метод успешно реализован при разработке биореактора с целью его использования в производстве холерной вакцины [16].

Есть данные по использованию при испытаниях фильтров в качестве контрольного аэрозоля 2,5% раствора гемоглобина. Исследование образцов осуществляют, применяя хемилюминесценцию. Если яркость реакции в пробах, отобранных после фильтра, более чем в 3 раза выше, чем в образцах, отобранных до фильтра, то происходит проникновение частиц гемоглобина сквозь испытуемый элемент. Это говорит о том, что фильтр нельзя допускать к эксплуатации. Исследователи анонсируют уменьшение времени нахождения коэффициента проскока и увеличение точности итогов контроля [15]. Однако мы не уверены в правомочности последнего тезиса, в силу того, что не осуществлялось сравнение с альтернативными способами.

Имеются данные о методе установления защитной эффективности металлокерамических фильтров по формуле (2) [8]. При этом исследователи объявили целью предложенного способа выдачу прогноза по коэффициенту проскока фильтрующего элемента на стадии проектирования по результатам расчетов.

$$K = \exp \left[ - \frac{2\Pi_{II} \times L \times D^2}{V_0 \times (a-r)^2} \right] \times 100\%, \quad (2)$$

где  $K$  — коэффициент проскока, %;  $\Pi_{\Gamma}$  — коэффициент полезной пористости металлокерамического фильтрующего материала, безразмерная величина;  $L$  — толщина фильтрующего слоя металлокерамического фильтрующего материала, м;  $D^{\Sigma}$  — суммарный коэффициент диффузии, который складывается из коэффициентов диффузии всех рассмотренных механизмов осаждения аэрозольных частиц,  $\text{м}^2/\text{с}$ ;  $V_0$  — скорость движения частицы аэрозоля в потоке воздуха,  $\text{м}/\text{с}$ ;  $r$  — средний радиус частицы аэрозоля, м;  $a$  — средний радиус канала поры металлокерамического фильтрующего материала, м.

### Заключение

Подводя итог представленному обзору методических подходов к контролю эффективности систем очистки биологических аэрозолей в биотехнологических процессах, целесообразно сделать следующее заключение. Проведенный анализ данных дал возможность показать существенные отрицательные моменты использования бактериальных аэрозолей: значительные траты и время, как правило, более 24 ч до определения возможности использования фильтров; нецелесообразность применения какого-либо микроорганизма, за исключением производственных штаммов, в оборудовании и на производственных площадях приготовления иммунобиологического лекарственного препарата для людей. Также выявлена перспективность применения физических методов испытаний с использованием для создания аэрозолей субстанций небактериального характера. Данные методы позволяют практически в режиме реального времени приобретать сведения о защитной эффективности фильтра.

### Литература

1. Алексеев С.М., Бушмелева Л.Р., Войтко Р.Н. Способ определения проницаемости аэрозольных фильтров в отношении микроорганизмов. Патент РФ № 2327142, опублик. 20.06.2008. Бюл. № 17.
2. Алёшкин А.В., Григорьев В.В., Афанасьев С.С., Галимзянов Х.М., Рубальский О.В., Афанасьев Д.С., Воропаева Е.А., Григорьева Г.В., Афанасьев М.С. Способ контроля защитной эффективности фильтра тонкой очистки воздуха бокса биологической безопасности. Патент РФ № 2443996, опублик. 27.02.2012. Бюл. № 6.
3. Басманов П.И., Кириченко В.Н., Филатов Ю.Н., Юров Ю.Л. Высокоэффективная очистка газов от аэрозолей фильтрами Петрянова. — М.: Наука, 2003. — 271 с.
4. Блинов Н.И., Смирнов Ю.И., Фролов В.Н., Басманов П.И., Будыка А.К. Генератор аэрозоля. Авторское свидетельство СССР № 1470346, опублик. 07.04.1989. Бюл. № 13.
5. Брюсов К.Н., Джарылгасов С.А., Джиндоян Л.С., Корнеева И.Г., Крашенинников О.А., Неуструев С.Г., Павлов Ю.В., Тотюнников А.В. Способ определения задерживающей способности фильтров тонкой очистки. Авторское свидетельство СССР № 1449586, опублик. 07.01.1989. Бюл. № 1.
6. Ененко А.А. Особенности проверки целостности НЕРА и ULPA фильтров боксов микробиологической безопасности // Технология чистоты. — 2014. — № 2. — С. 14–19.
7. Костюкова Т.А., Смоленский В.Ю., Ляпин М.Н. Разработка инструктивно-методической базы учреждения как элемента обеспечения биобезопасности работ с патогенными биологическими агентами // Проблемы особо опасных инфекций. — 2014. — № 3. — С. 25–29.
8. Кравченко О.В., Болдакова И.В., Широков М.С., Болдаков А.М., Богатырёв А.А. Расчетный способ определения коэффициента проскока пористых металлокерамических фильтрующих материалов. Патент РФ № 2423159, опублик. 10.07.2011. Бюл. № 19.
9. Мотина Г.Л., Батова Л.К., Чайковская С.М., Макарова Р.А. Методы испытаний фильтрующих материалов бактериальным аэрозолем // Химико-фармацевтический журнал. — 1973. — № 6. — С. 23–26.
10. Перепелица А.И., Васин Ю.Г., Комиссаров А.В., Морозов К.М., Никифоров А.К. Система очистки отходящих газов биореактора от биологического аэрозоля // Современные проблемы науки и образования. — 2015. — № 1–1. — С. 227. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=18542> (дата обращения: 16.06.2019).
11. Петрянов И.В., Кошечев В.С., Басманов П.И., Борисов Н.Б., Гольдштейн Д.С., Шатский С.Н., Филатов Ю.Н., Кириченко В.Н. «Лепесток». Легкие респираторы. 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Наука, 2015. — 320 с.
12. Самыгин В.М., Владимцева И.В., Гришкина Т.А., Александров А.Ю., Редкозубов С.В. Конструкция установки для глубинного культивирования аэробных патогенов // Биотехнология. — 2008. — № 2. — С. 65–68.
13. Самыгин В.М., Гришкина Т.А., Жога Л.К., Александров А.Ю., Редкозубов С.В., Нгуен Тхи Нгок Минь. Система защиты окружающей среды от бактериальных аэрозолей в установках для культивирования микроорганизмов // Проблемы особо опасных инфекций. — 2009. — № 2(100). — С. 22–26.
14. Смирнов Г.Г., Медведев Н.П., Сенькин А.В. Автоматизированная стендовая установка для оценки эффективности фильтров тонкой очистки воздуха // Проблемы особо опасных инфекций. — 2011. — № 2. — С. 27–29.
15. Терновая С.Ф., Осипов Б.В., Буреев И.А. Мухаметгалиев Х.Г., Артищев Ю.И., Буткин А.В. Метка аэрозолей для определения эффективности фильтров вентиляционных систем. Патент СССР № 1661631, опублик. 07.07.1991. Бюл. № 25.

16. Ульянов А.Ю., Еремин С.А., Никифоров А.К., Васин Ю.Г., Щербakov Д.А., Комиссаров А.В. Разработка биореактора и оценка возможности его использования в производстве холерной вакцины // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. — 2011. — № 1. — С. 39–43.
17. Хаякава И., Окадзаки Т., Фудзии С. Чистые помещения. — М.: Мир, 1990. — 454 с.
18. Чупалов В.С. Основы оценки эффективности воздушных фильтров // Инженерные системы. АВОК — Северо-Запад. — 2007. — № 1(27). — С. 14–22.
19. Benezech T. A method for assessing the bacterial retention ability of hydrophobic membrane filters // Trends Food Sci. Technol. — 2001. — Vol. 12(1). — P. 36–38.
20. Brochot C., Mouret G., Michielsen N., Chazelet S., Thomas D. Penetration of nanoparticles in 5 nm to 400 nm size range through two selected fibrous media // Journal of Physics Conference Series. — 2011. — Vol. 304(1). — Art. 012068. doi: 10.1088/1742-6596/304/1/012068.
21. Buha J., Fissan H., Wang J. Filtration behavior of silver nanoparticle agglomerates and effects of the agglomerate model in data analysis // J. Nanopart. Res. — 2013. — Vol. 15(7). — Art. 1709. doi: 10.1007/s11051-013-1709-z.
22. Cho H.W., Yoon C.S., Lee J.H., Lee S.J., Viner A., Johnson E.W. Comparison of pressure drop and filtration efficiency of particulate respirators using welding fumes and sodium chloride // Ann. Occup. Hyg. — 2011. — Vol. 55(6). — P. 666–680.
23. Conway R.S. State of the art in fermentation air filtration // Biotechnol. Bioeng. — 1984. — Vol. 26. — P. 844–847.
24. Dosmar M., Wolber P., Bracht K., Tröger H., Waibel P. The Water Pressure Integrity Test — a new integrity test for hydrophobic membrane filters // J. Parenter. Sci. Technol. — 1992. — Vol. 46(4). — P. 102–106.
25. Duberstein R., Howard G. Sterile filtration of gases: a bacterial aerosol challenge test // J. Parenter. Drug Assoc. — 1978. — Vol. 32(4). — P. 192–198.
26. Golanski L., Guiot A., Rouillon F., Pocachard J., Tardif F. Experimental evaluation of personal protection devices against graphite nanoaerosols: fibrous filter media, masks, protective clothing, and gloves // Hum. Exp. Toxicol. — 2009. — Vol. 28(6–7). — P. 353–359.
27. Hinds W.C. Aerosol technology: properties, behavior, and measurement of airborne particles. — New York: Wiley-Interscience, 1999. — 4 p.
28. Holton J., Webb A.R. An evaluation of the microbial retention performance of three ventilator-circuit filters // Intensive Care Med. — 1994. — Vol. 20(3). — P. 233–237.
29. Hounam R.F., Morgan D.J., O'Connor D.T., Sherwood R.J. The evaluation of protection provided by respirators // Ann. Occup. Hyg. — 1964. — Vol. 7(4). — P. 353–363.
30. Jovanović-Kovačević O.Ž., Vidmar M., Tubić M., Teofilovski Č., Patić D., Smiljanić R. Sodium chloride aerosol generation method for high efficiency particulate air filter testing // Isotopenpraxis Isotopes in Environmental and Health Studies. — 1979. — Vol. 15(9). — P. 288–290.
31. Kastelein J., Logtenberg M.T., Hesselink P.G. Testing and evaluation of off-gas filters for bioreactors by a new bacterial aerosol challenge test method (TBAC) // Enzyme Microb. Technol. — 1992. — Vol. 14(7). — P. 553–560.
32. Kim S.C., Harrington M.S., Pui D.Y.H. Experimental study of nanoparticles penetration through commercial filter media // Journal of Nanoparticle Research. — 2007. — Vol. 9(1). — P. 117–125.
33. Kousaka Y., Okuyama K., Shimada M., Takii Y. Development of a method for testing very high-efficiency membrane filters for ultrafine aerosol particles // J. Chem. Eng. Japan. — 1990. — Vol. 23(5). — P. 568–574.
34. Lamb G.E.R. Use of ambient aerosols for measuring filter efficiencies // Aerosol Sci. Tech. — 1995. — Vol. 23(2). — P. 250–252.
35. Leahy T.J., Gabler R. Sterile filtration of gases by membrane filters // Biotechnol. Bioeng. — 1984. — Vol. 26(8). — P. 836–843.
36. Lee K.W., Liu B.Y.H. Experimental study of aerosol filtration by Fibrous filters // Aerosol Science and Technology. — 1981. — Vol. 1(1). — P. 35–46.
37. Mouret G., Chazelet S., Thomas D., Bemer D. Discussion about the thermal rebound of nanoparticles // Separation and Purification Technology. — 2011. — Vol. 78(2). — P. 125–131.
38. Rengasamy S., King W.P., Eimer B.C., Shaffer R.E. Filtration performance of NIOSH-approved N95 and P100 filtering facepiece respirators against 4 to 30 nanometer-size nanoparticles // J. Occup. Environ. Hyg. — 2008. — Vol. 5(9). — P. 556–564.
39. Rengasamy S., Eimer B.C., Shaffer R.E. Comparison of nanoparticle filtration performance of NIOSH-approved and CE-marked particulate filtering facepiece respirators // Ann. Occup. Hyg. — 2009. — Vol. 53(2). — P. 117–128.
40. Schwyn S., Garwin E., Schmidt-Ott A. Aerosol generation by spark discharge // Journal of Aerosol Science. — 1988. — Vol. 19(5). — P. 639–642.
41. Shin W.G., Mulholland G.W., Kim S.C., Pui D.Y.H. Experimental study of filtration efficiency of nanoparticles below 20 nm at elevated temperatures // Journal of Aerosol Science. — 2008. — Vol. 39(6). — P. 488–499.
42. Sterling M., Jornitz M.W., Meltzer T.H. Aerosol challenging of vent filters: Titre reductions at different humidities and flow rates // Pharmaceutical Technology Europe. — 2004. — October. — P. 28–32.
43. Sykes G., Carter D.V. Air filters for small-scale aseptic units // J. Pharm. Pharmacol. — 1953. — Vol. 5(11). — P. 945–953.
44. Thomas D., Mouret G., Cadavid-Rodriguez M.C., Chazelet S., Bémer D. An improved model for the penetration of charged and neutral aerosols in the 4 to 80 nm range through stainless steel and dielectric meshes // Journal of Aerosol Science. — 2013. — Vol. 57. — P. 32–44.

45. Wang J., Tronville P. Toward standardized test methods to determine the effectiveness of filtration media against airborne nanoparticles // *J. Nanopart. Res.* — 2014. — Vol. 16(6). — Art. 2417. doi: 10.1007/s11051-014-2417-z.

## References

- Alekseyev SM, Bushmeleva LR, Voytko RN. Sposob opredeleniya pronitsayemosti aerazol'nykh fil'trov v otnoshenii mikroorganizmov. Patent RF № 2327142, opubl. 20.06.2008. Byul. № 17 (in Russian).
- Aloshkin AV, Grigor'yev VV, Afanas'yev SS, Galimzyanov KHM, Rubal'skiy OV, Afanas'yev DS, Voropayeva YeA, Grigor'yeva GV, Afanas'yev MS. Sposob kontrolya zashchitnoy effektivnosti fil'tra tonkoy ochistki vozdukha boksa biologicheskoy bezopasnosti. Patent RF № 2443996, opubl. 27.02.2012. Byul. № 6 (in Russian).
- Basmanov PI, Kirichenko VN, Filatov YuN, Yurov YuL. Vysokoeffektivnaya ochistka gazov ot aerazoley fil'trami Petryanova. Moscow: Nauka, 2003: 271 (in Russian).
- Blinov NI, Smirnov YuI, Frolov VN, Basmanov PI, Budyka AK. Generator aerolya. Avtorskoye svidetel'stvo SSSR № 1470346, opubl. 07.04.1989. Byul. № 13 (in Russian).
- Bryusov KN, Dzharlygasov SA, Dzhindoyan LS, Korneyeva IG, Krashennnikov OA, Neustruyev SG, Pavlov YuV, Tyutyunnikov AV. Sposob opredeleniya zaderzhivayushchey sposobnosti fil'trov tonkoy ochistki. Avtorskoye svidetel'stvo SSSR № 1449586, opubl. 07.01.1989. Byul. № 1 (in Russian).
- Yenko AA. Osobennosti proverki tselostnosti NERA i ULPA fil'trov boksov mikrobiologicheskoy bezopasnosti. *Tekhnologiya chistoty* 2014; 2:14–19 (in Russian).
- Kostyukova TA, Smolenskiy VYu, Lyapin MN. Razrabotka instruktivno-metodicheskoy bazy uchrezhdeniya kak elementa obespecheniya biobezopasnosti rabot s patogennymi biologicheskimi agentami. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2014; 3:25–29 (in Russian).
- Kravchenko OV, Boldakova IV, Shirokov MS, Boldakov AM, Bogatyrov AA. Raschetnyy sposob opredeleniya koeffitsiyenta proskoka poristykh metallokeramicheskikh fil'truyushchikh materialov. Patent RF № 2423159, opubl. 10.07.2011. Byul. № 19 (in Russian).
- Motina GL, Batova LK, Chaykovskaya SM, Makarova RA. Metody ispytaniy fil'truyushchikh materialov bakterial'nym aerozolem. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal* 1973; 6:23–26. (in Russian).
- Perepelitsa AI, Vasin YuG, Komissarov AV, Morozov KM, Nikiforov AK. Sistema ochistki otkhodyashchikh gazov bioreaktora ot biologicheskogo aerolya. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya* 2015; 1–1:227. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=18542> (data of access: 16.06.2019) (in Russian).
- Petryanov IV, Koshcheyev VS, Basmanov PI, Borisov NB, Gol'dshteyn DS, Shatskiy SN, Filatov YUN, Kirichenko VN. «Lepetok». Legkiye respiratory. 2-ye izd., pererab. i dop. Moscow: Nauka, 2015: 320 (in Russian).
- Samygin VM, Vladimtseva IV, Grishkina TA, Aleksandrov AYu, Redkozubov SV. Konstruktsiya ustanovki dlya glubinnogo kul'tivirovaniya aerobnykh patogenov. *Biotekhnologiya* 2008; 2:65–68 (in Russian).
- Samygin VM, Grishkina TA, Zhoga LK, Aleksandrov AYu, Redkozubov SV, Nguyen Tkhi Ngok Min'. Sistema zashchity okruzhayushchey sredy ot bakterial'nykh aerazoley v ustanovkakh dlya kul'tivirovaniya mikroorganizmov. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2009; 2(100):22–26 (in Russian).
- Smirnov GG, Medvedev NP, Sen'kin AV. Avtomatizirovannaya stendovaya ustanovka dlya otsenki effektivnosti fil'trov tonkoy ochistki vozdukha. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2011; 2:27–29 (in Russian).
- Ternovaya SF, Osipov BV, Bureyev IA, Mukhametgaliyev KHG, Artishchev YuI, Butkin AV. Metka aerazoley dlya opredeleniya effektivnosti fil'trov ventilyatsionnykh sistem. Patent SSSR № 1661631, opubl. 07.07.1991. Byul. № 25 (in Russian).
- Ul'yanov AYu, Yerebin SA, Nikiforov AK, Vasin YuG, Shcherbakov DA, Komissarov AV. Razrabotka bioreaktora i otsenka vozmozhnosti yego ispol'zovaniya v proizvodstve kholerney vaksiny. *Vestnik Saratovskogo gosagrouniversiteta im NI Vavilova* 2011; 1:39–43 (in Russian).
- Khayakava I, Okadzaki T, Fudzii S. Chistyye pomescheniya. Moscow: Mir, 1990: 454 (in Russian).
- Chupalov BC. Osnovy otsenki effektivnosti vozdukhnykh fil'trov. *Inzhenernyye sistemy. AVOK — Severo-Zapad* 2007; 1(27):14–22 (in Russian).
- Benezech T. A method for assessing the bacterial retention ability of hydrophobic membrane filters. *Trends Food Sci Technol* 2001; 12(1):36–38.
- Brochot C, Mouret G, Michielsen N, Chazelet S, Thomas D. Penetration of nanoparticles in 5 nm to 400 nm size range through two selected fibrous media. *Journal of Physics Conference Series* 2011; 304(1):012068. doi: 10.1088/1742-6596/304/1/012068.
- Buha J, Fissan H, Wang J. Filtration behavior of silver nanoparticle agglomerates and effects of the agglomerate model in data analysis. *J Nanopart Res* 2013; 15(7):1709. doi: 10.1007/s11051-013-1709-z.
- Cho HW, Yoon CS, Lee JH, Lee SJ, Viner A, Johnson EW. Comparison of pressure drop and filtration efficiency of particulate respirators using welding fumes and sodium chloride. *Ann Occup Hyg* 2011; 55(6):666–680.
- Conway RS. State of the art in fermentation air filtration. *Biotechnol Bioeng* 1984; 26:844–847.
- Dosmar M, Wolber P, Bracht K, Tröger H, Waibel P. The Water Pressure Integrity Test — a new integrity test for hydrophobic membrane filters. *J Parenter Sci Technol* 1992; 46(4):102–106.

25. Duberstein R, Howard G. Sterile filtration of gases: a bacterial aerosol challenge test. *J Parenter Drug Assoc* 1978; 32(4):192–198.
26. Golanski L, Guiot A, Rouillon F, Pocachard J, Tardif F. Experimental evaluation of personal protection devices against graphite nanoaerosols: fibrous filter media, masks, protective clothing, and gloves. *Hum Exp Toxicol* 2009; 28(6–7):353–359.
27. Hinds WC. *Aerosol technology: properties, behavior, and measurement of airborne particles*. New York: Wiley-Interscience, 1999: 4.
28. Holton J, Webb AR. An evaluation of the microbial retention performance of three ventilator-circuit filters. *Intensive Care Med* 1994; 20(3):233–237.
29. Hounam RF, Morgan DJ, O'Connor DT, Sherwood RJ. The evaluation of protection provided by respirators. *Ann Occup Hyg* 1964; 7(4):353–363.
30. Jovanović-Kovačević OŽ, Vidmar M, Tubić M, Teofilovski Ć, Patić D, Smiljanić R. Sodium chloride aerosol generation method for high efficiency particulate air filter testing. *Isotopopraxis Isotopes in Environmental and Health Studies* 1979; 15(9):288–290.
31. Kastelein J, Logtenberg MT, Hesselink PG. Testing and evaluation of off-gas filters for bioreactors by a new bacterial aerosol challenge test method (TBAC). *Enzyme Microb Technol* 1992; 14(7):553–560.
32. Kim SC, Harrington MS, Pui DYH. Experimental study of nanoparticles penetration through commercial filter media. *Journal of Nanoparticle Research* 2007; 9(1):117–125.
33. Kousaka Y, Okuyama K, Shimada M, Takii Y. Development of a method for testing very high-efficiency membrane filters for ultrafine aerosol particles. *J Chem Eng Japan* 1990; 23(5):568–574.
34. Lamb GER. Use of ambient aerosols for measuring filter efficiencies. *Aerosol Sci Tech* 1995; 23(2):250–252.
35. Leahy TJ, Gabler R. Sterile filtration of gases by membrane filters. *Biotechnol Bioeng* 1984; 26(8):836–843.
36. Lee KW, Liu BYH. Experimental study of aerosol filtration by Fibrous filters. *Aerosol Science and Technology* 1981; 1(1):35–46.
37. Mouret G, Chazelet S, Thomas D, Bemer D. Discussion about the thermal rebound of nanoparticles. *Separation and Purification Technology* 2011; 78(2):125–131.
38. Rengasamy S, King WP, Eimer BC, Shaffer RE. Filtration performance of NIOSH-approved N95 and P100 filtering facepiece respirators against 4 to 30 nanometer-size nanoparticles. *J Occup Environ Hyg* 2008; 5(9):556–564.
39. Rengasamy S, Eimer BC, Shaffer RE. Comparison of nanoparticle filtration performance of NIOSH-approved and CE-marked particulate filtering facepiece respirators. *Ann Occup Hyg* 2009; 53(2):117–128.
40. Schwyn S, Garwin E, Schmidt-Ott A. Aerosol generation by spark discharge. *Journal of Aerosol Science* 1988; 19(5):639–642.
41. Shin WG, Mulholland GW, Kim SC, Pui DYH. Experimental study of filtration efficiency of nanoparticles below 20 nm at elevated temperatures. *Journal of Aerosol Science* 2008; 39(6):488–499.
42. Sterling M, Jormitz MW, Meltzer TH. Aerosol challenging of vent filters: Titre reductions at different humidities and flow rates. *Pharmaceutical Technology Europe* 2004; October: 28–32.
43. Sykes G, Carter DV. Air filters for small-scale aseptic units. *J Pharm Pharmacol* 1953; 5(11):945–953.
44. Thomas D, Mouret G, Cadavid-Rodriguez MC, Chazelet S, Bémer D. An improved model for the penetration of charged and neutral aerosols in the 4 to 80 nm range through stainless steel and dielectric meshes. *Journal of Aerosol Science* 2013; 57:32–44.
45. Wang J, Tronville P. Toward standardized test methods to determine the effectiveness of filtration media against airborne nanoparticles. *J Nanopart Res* 2014; 16(6):2417. doi: 10.1007/s11051-014-2417-z.

## METHODOLOGICAL APPROACHES TO MONITORING THE EFFICIENCY OF BIOLOGICAL AEROSOLS PURIFICATION SYSTEMS IN BIOTECHNOLOGICAL PROCESSES (LITERATURE REVIEW)

A.V. KOMISSAROV<sup>1</sup>, O.A. VOLOKH<sup>1</sup>, K.M. MOROZOV<sup>1</sup>, A.K. NIKIFOROV<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»*,

<sup>2</sup>*Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, «Mikrob»*, Saratov

In a number of biotechnological processes, particularly in the production of vaccines, microorganisms of various pathogenicity are used. During the course of the processes, bioaerosols are inevitably generated, which imposes increased requirements on the reliability of the operation of systems for removing them. Inherently, there is a need to control these systems. Therefore, the main objective of the study was to analyze the data in regulatory documents, scientific periodicals and patents for inventions, revealing methodological

approaches to monitoring the effectiveness of biological aerosol purification systems during biotechnological processes and, first of all, for use in cultivating microorganisms in bioreactors. Aspects of the application of biological and physico-chemical methods of testing the efficiency of biological aerosol purification systems, as well as filters for the retention capacity, are considered in this work. Their advantages and disadvantages have been identified. The application of physical testing methods with the use of non-biological substances as testing aerosols is shown to be promising, due to the fact that they allow almost real-time conclusions about the protective effectiveness of the filter. The presented data make it possible to take into account both negative and positive aspects of the decisions presented in the article on methodological approaches to monitoring the effectiveness of biological aerosol purification systems in biotechnological processes when selecting them.

*Keywords:* biotechnological processes, efficiency control of biological aerosol purification systems, biological and physicochemical methods, reviews.

**Address:**

Komissarov A.V., Ph.D.  
Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»  
E-mail: komissarov-9@yandex.ru

**Для цитирования:**

Комиссаров А.В., Волох О.А., Морозов К.М., Никифоров А.К. Методические подходы к контролю эффективности систем очистки биологических аэрозолей в биотехнологических процессах (обзор литературы). Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(4):93–102.

**For citation:**

Komissarov A.V., Volokh O.A., Morozov, K.M. Nikiforov A.K. Methodological approaches to monitoring the efficiency of biological aerosols purification systems in biotechnological processes (literature review). Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(4):93–102 (in Russian).

## ПЕРСПЕКТИВЫ РАСШИРЕНИЯ АССОРТИМЕНТА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ-КОМПОНЕНТОВ СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Н.С. ЛЯХОВЧЕНКО\*, В.Ю. СЕНЧЕНКОВ, И.А. НИКИШИН, И.П. СОЛЯНИКОВА

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород

Целью настоящей работы было создание рабочей коллекции для анализа перспективы расширения ассортимента штаммов-антагонистов возбудителей болезней. Проводили оценку антагонистической активности выделенных изолятов в отношении некоторых фитопатогенов. Показано, что выделенные штаммы микроорганизмов с антагонистической активностью из реки Везёлка и почвы Белгородской области обладают биотехнологическим потенциалом в области разработки средств защиты растений биологического происхождения. Например, выделен ряд штаммов, обладающих антибактериальными и противогрибковыми свойствами.

*Ключевые слова:* бактериальные штаммы, биологические средства защиты растений, перспективы исследований.

Известно, что в природе микроорганизмы тесно взаимодействуют как между собой, так и с макроорганизмами. Формы взаимоотношений варьируют от симбиотических до паразитических. В целом, все микробы, которые образуют ассоциации с хозяином (например, с растением), независимо от форм отношений, должны вливаться в трофические, химические и физические процессы носителя [12]. Молекулярные процессы позволяют микроорганизмам реализовать стратегии колонизации носителя. Например, имеются сведения о том, что некоторые филобактерии (заселяющие листья растений) используют ряд таких стратегий, этапы которых можно подразделить на локальное изменение среды (некоторые микроорганизмы могут обогащать среду внеклеточными метаболитами для улучшения питательных свойств среды), агрегацию, ингрессию и эгрессию [4].

Антагонистические формы взаимоотношений могут быть причиной развития заболеваний растений — фитопатологий [2]. Антагонистический потенциал может быть обусловлен механизмом чувства кворума (QS). Это явление межклеточной коммуникации у микроорганизмов, обусловленное различными сигналь-

ными молекулами (аутоиндукторами), обеспечивающее взаимодействие между клетками (при этом координируя групповое поведение) [13]. Благодаря механизмам QS бактерии могут ощущать изменения в плотности популяции своего вида и других в сообществе. С увеличением плотности микробных клеток, а также концентрации сигнальных молекул в окружающей среде бактерии изменяют и координируют взаимодействие между клетками, активируя экспрессию генов, участвующих в достижении определенных физиологических функций и регуляторных механизмов [13]. Помимо чувства кворума, значительную роль в колонизации растений болезнетворными микроорганизмами играет система секреции третьего типа (ССЗТ) [6]. ССЗТ представляет собой сложный молекулярный ансамбль (3,5 МДа), состоящий из более чем 20 белков. Общую структуру можно подразделить на три кластера: внеклеточные придатки, базальное тело и цитоплазматические компоненты [7].

Однако макроорганизмы способны противостоять воздействию болезнетворных микробов. Так, растения могут активировать арсенал индуцируемых защитных механизмов, которые включают в себя активные формы кислорода (АФК), укрепление клеточной стенки, накопление обогащенных гидроксипролинов, гликопротеидов и вторичных метаболитов с антимикробным свойством. Имеются сведения о том, что молекулярные механизмы, которые лежат в основе активации защитных реакций растений сложны и зависят от биосинтеза абсцизовой, салициловой и жасмоновой кислот, этилена, гиббереллинов, ауксинов, цитокининов и других модуляторов

© 2022 г. Ляховченко Н.С., Сенченков В.Ю., Никишин И.А., Соляникова И.П.

\* Автор для переписки:

Ляховченко Никита Сергеевич  
аспирант, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»  
E-mail: lyakhovchenko@bsu.edu.ru

иммунного ответа [7]. Однако многие микроорганизмы обладают механизмами, позволяющими обойти иммунную систему растений.

Фитопатогены способны нанести значительный ущерб сельскому хозяйству. Поэтому широко применяют средства защиты растений (как химического, так и биологического происхождения). В ходе анализа государственного каталога пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации по состоянию на 31 января 2020 года, выявлено, что наибольшую долю от общего количества препаратов составили гербициды (41,2%) на основе химических веществ. Меньшую долю составляют фунгициды (26,1%), тем не менее среди них наблюдается несколько большее количество препаратов на основе микроорганизмов (около 5,8%), чем в других категориях [1]. Из-за условной токсичности средств химической защиты программой развития биотехнологий (ТП «БиоТех-2030») обозначено развитие направления биологизации земледелия. Микроорганизмы в качестве активных компонентов могут адаптироваться к метаболическому профилю флоры растения, действуя на молекулярные процессы, не снижая общей численности патогенов. В результате этого в сообществе не образуется свободной ниши, не изменяется микробный профиль и не нарушается сопряженность видов [2].

Целью настоящей работы было создание рабочей коллекции для оценки перспектив расширения ассортимента штаммов-антагонистов возбудителей болезней, так как современные тенденции разработки средств защиты растений направлены на биологизацию, а именно: на замену действующих химических пестицидов на биологические (например, микроорганизмы-антагонисты и их вторичные метаболиты). Данное направление требует поиска новых эффективных продуцентов антибиотических веществ и разработки комплекса оптимальных параметров для получения биологически активных веществ.

Конкретная задача сводилась к оценке антагонистической активности выделенных изолятов в отношении некоторых фитопатогенов. Бактериальные штаммы-антагонисты фитопатогенов выделяли из почвенных и водных образцов и проверяли относительно таких бактериальных штаммов, как *Ralstonia* sp. 7-1, *Pseudomonas aeruginosa* ML4262, *P. putida* KT2442, *P. protegens* 38a, *P. chlororaphis* PCL1391, *P. fluorescens* B 849, *P. caryophylli* ВКМ 1290, *P. savastanoi* ВКМ В-1546, *Erwinia herbicola* ATCC 27155, *Alcaligenes faecalis* ВКМ 1518, *Bacillus cereus* GA5T, *B. weihnstephanensis* КВА4, *B. subtilis*, *B. shaericus* ВКМ В509-1, *B. thuringiensis* ATCC 35646, *B. flexsus*, *Micrococcus luteus* В1891,

*M. roseus* В1236, *Arthrobacter* sp. В52, *Deinococcus radiodurans*, *Achromobacter ruhlandii* ВКМ В-1330, *Pectobacterium carotovorum* ВКМ В-1247, *P. wasabiae* В15, *Agrobacterium tumefaciens* GV3101(ρMP90RK), *A. tumefaciens* СВЕ21, *Pantoea agglomerans* ATCC 27155.

Для оценки противогрибковой активности использовали *Aspergillus unguis* ВКМ F-1754, *Fusarium avenaceum* ВКМ F-132, *Alternaria brassicicola* ВКМ F-1864, *Penicillium gladioli* ВКМ F-2088.

В ходе оценки антагонистического потенциала аборигенного пигментообразующего штамма, выделенного из реки Везёлка и идентифицированного как *Janthinobacterium lividum* (ВКМ В-3515), выявлено, что штамм обладает слабовыраженной антибактериальной активностью лишь в отношении двух граммотрицательных бактерий рода *Pseudomonas* и двух грамположительных бактерий родов *Micrococcus* и *Achromobacter* и антимицотной активностью в отношении плесневых грибов *A. brassicicola* ВКМ F-1864, *A. unguis* ВКМ F-1754, *F. avenaceum* ВКМ F-132, *P. gladioli* ВКМ F-2088 [8, 9].

Показано, что степень ингибирования *A. brassicicola* ВКМ F-1864 при совместном культивировании с *J. lividum* ВКМ В-3515 составила 24% [9]. Микостатическая активность *J. lividum* ВКМ В-3515 обуславливает ее биотехнологический потенциал за счет образования биологически активного пигмента — виолацеина. Согласно литературным данным, этот пигмент обладает рядом свойств, среди которых противогрибковые, антибактериальные, противоопухолевые и другие [11].

Из почв Белгородской области был выделен ряд штаммов, обладающих антибактериальными и противогрибковыми свойствами [8]. В ходе исследования индивидуальных свойств и анализа последовательностей 16S РНК была определена таксономическая принадлежность штаммов к таким родам, как *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Priestia* [5]. Например, все изоляты оказались активны в отношении *A. tumefaciens* GV3101, *A. tumefaciens* СВЕ21.

Выявлено, что *P. chlororaphis*, задепонированный во Всероссийской коллекции под номером В-3546D, оказался эффективным в отношении *P. savastanoi* ВКМ В-1546, *P. carotovorum* ВКМ В-1247, *P. wasabiae* В15, *C. michiganensis* Ас-1403 и таких плесневых грибов, как *A. unguis* ВКМ F-1754, *F. avenaceum* ВКМ F-132, *A. brassicicola* ВКМ F-1864, *P. gladioli* ВКМ F-2088 [10]. Известно, что для *P. chlororaphis* характерно образование антибиотиков феназинового ряда, которые могут обуславливать высокую антибиотическую активность [3].

В свою очередь, выделенные штаммы, идентифицированные как *B. subtilis* под номерами 18 и 27, проявили анта-

гонистическую активность в отношении *P. savastanoi* ВКМ В-1546, *P. carotovorum* ВКМ В-1247, *P. wasabiae* В15 и *F. avenaceum* ВКМ F-132 [5]. Изолят *P. aryabhatai* 28 оказался активным только в отношении *A. tumefaciens* СВЕ21, *A. tumefaciens* GV3101 и *F. avenaceum* ВКМ F-132, тогда как остальные тест-культуры не подавлялись [5].

Таким образом, выделенные штаммы микроорганизмов с антагонистической активностью из реки Везёлка и почвы Белгородской области, обладают биотехнологическим потенциалом в области разработки средств защиты растений биологического происхождения, так как они проявили активность в отношении фитопатогенных тест-культур. Разработка препаратов на основе микроорганизмов может включать в себя комбинирование разных штаммов. Расширение ассортимента потенциальных продуцентов может способствовать повышению эффективности предполагаемых препаратов, так как снижается риск адаптации микробного сообщества к постороннему микроорганизму и увеличивается время достижения сопряженности видов. Кроме того, тенденция к биологизации средств защиты растений позволяет исключить накопление потенциальных поллютантов в почве и культурных растениях (например, сульфат меди).

Работа поддержана Грантом № 075-15-2022-1059.

## Литература

1. Информация в «Государственном каталоге пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации», приведена по состоянию на 31 января 2020 г.
2. Штерншиш М.В., Джалилов Ф.С.-У., Андреева И.В., Томилова О.Г. Биологическая защита растений (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений). — М.: КолосС, 2004. — 264 с.
3. Avakova A., Lyakhovchenko N., Lopin R, Goltseva E., Belozerskikh M., Solyanikova I. Antagonistic activity of the native strain of *Pseudomonas chlororaphis* 3 of the Belgorod region against the bacterium of the genus *Ralstonia*, ILS 2021 // BIO Web of Conferences. — 2021. — Vol. 40. — Art. 01008 doi: 10.1051/bioconf/20214001008.
4. Beattie G.A., Lindow S.E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies // *Phytopathology*. — 1999. — Vol. 89. — No. 5. — P. 353–359.
5. Esikova T.Z., Anokhina T.O., Abashina T.N., Suzina N.E., Solyanikova I.P. Characterization of soil bacteria with potential to degrade benzoate and antagonistic to fungal and bacterial phytopathogens // *Microorganisms*. — 2021. — Vol. 9. — Art. 755. doi: 10.3390/microorganisms9040755.

6. Fagard M. et al. Nitrogen metabolism meets phytopathology // *Journal of experimental botany*. — 2014. — Vol. 65. — No. 19. — P. 5643–5656.
7. Gaytán M.O. et al. Type three secretion system in attaching and effacing pathogens // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. — 2016. — Vol. 6. — Art. 129. doi: 10.3389/fcimb.2016.00129.
8. Lyakhovchenko N.S., Abashina T.N., Polivtseva V.N., Senchenkov V.Y., Pribylov D.A., Chepurina A.A., Nikishin I.A., Avakova A.A., Goyanov, M.A., Gubina E.D. et al. A blue-purple pigment-producing bacterium isolated from the Vezelka river in the city of Belgorod // *Microorganisms*. — 2021. — Vol. 9. — Art. 102. doi: 10.3390/microorganisms9010102.
9. Lyakhovchenko N.S., Nikishin I.A., Gubina E.D., Pribylov D.A., Senchenkov V.Y., Sirotin A.A., Solyanikova I.P. Assessment of the antifungal activity of the violacein-forming strain *Janthinobacterium* sp. B-3515 against the mould fungus *Alternaria brassicicola* F-1864 // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*: 4, Ulan-Ude, 15–18 June 2021. — Ulan-Ude, 2021. — P. 012006. doi: 10.1088/1755-1315/908/1/012006.
10. Mavrodi D.V., Blankenfeldt W., Thomashow L.S. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation // *Annual Review of Phytopathology*. — 2006. — Vol. 44(1). — 417–445.
11. Pantanella F., Berlutti F., Passariello C., Sarli S., Morea C. and Schippa S. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum* // *Journal of Applied Microbiology*. — 2007. — Vol. 102. — P. 992–999.
12. Pierson III L.S., Pierson E.A. Roles of diffusible signals in communication among plant-associated bacteria // *Phytopathology*. — 2007. — Vol. 97. — No. 2. — P. 227–232.
13. Wang M., Zhu P., Jiang J., Zhu H., Tan S. Signaling molecules of quorum sensing in bacteria // *Rev. Biotechnol. Biochem.* — 2020. — Vol. 1. — No. 1. — P. 002. URL: <https://asteroidpublishers.com/uploads/articlepdfs/RBB-00223369.pdf>.

## References

1. Informatsiya v «Gosudarstvennom kataloge pestitsidov i agrokhimikatov, razreshennykh k primeneniyu na territorii Rossiyskoy Federatsii», privedena po sostoyaniyu na 31 yanvarya 2020 g (in Russian).
2. Shternshis MV, Dzhaililov FS-U, Andreyeva IV, Tomilova OG. Biologicheskaya zashchita rasteniy (Uchebniki i ucheb posobiya dlya studentov vyssh ucheb zavedeniy). Moscow: KolosS, 2004: 264 (in Russian).
3. Avakova A, Lyakhovchenko N, Lopin R, Goltseva E, Belozerskikh M, Solyanikova I. Antagonistic activity of the native strain of *Pseudomonas chlororaphis* 3 of the Belgorod region against the bacterium of the genus *Ralstonia*, ILS 2021. *BIO Web of Conferences* 2021; 40:01008 doi: 10.1051/bioconf/20214001008.

4. Beattie GA, Lindow SE. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology* 1999; 89(5):353–359.
5. Esikova TZ, Anokhina TO, Abashina TN, Suzina NE, Solyanikova IP. Characterization of soil bacteria with potential to degrade benzoate and antagonistic to fungal and bacterial phytopathogens. *Microorganisms* 2021; 9:755. doi: 10.3390/microorganisms9040755.
6. Fagard M et al. Nitrogen metabolism meets phytopathology. *Journal of experimental botany* 2014; 65(19):5643–5656.
7. Gaytán MO et al. Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2016; 6:129. doi: 10.3389/fcimb.2016.00129.
8. Lyakhovchenko NS, Abashina TN, Polivtseva VN, Senchenkov VY, Pribylov DA, Chepurina AA, Nikishin IA, Avakova AA, Goyanov, MA, Gubina ED et al. A blue-purple pigment-producing bacterium isolated from the Vezelka river in the city of Belgorod. *Microorganisms* 2021; 9:102. doi: 10.3390/microorganisms9010102.
9. Lyakhovchenko NS, Nikishin IA, Gubina ED, Pribylov DA, Senchenkov VY, Sirotin AA, Solyanikova IP. Assessment of the antifungal activity of the violacein-forming strain *Janthinobacterium* sp. B-3515 against the mould fungus *Alternaria brassicicola* F-1864. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science: 4, Ulan-Ude, 15–18 June 2021. Ulan-Ude, 2021:012006. doi: 10.1088/1755-1315/908/1/012006.
10. Mavrodi DV, Blankenfeldt W, Thomashow LS. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annual Review of Phytopathology* 2006; 44(1):417–445.
11. Pantanella F, Berlutti F, Passariello C, Sarli S, Morea C and Schippa S. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *Journal of Applied Microbiology* 2007; 102:992–999.
12. Pierson III LS, Pierson EA. Roles of diffusible signals in communication among plant-associated bacteria. *Phytopathology* 2007; 97(2):227–232.
13. Wang M, Zhu P, Jiang J, Zhu H, Tan S. Signaling molecules of quorum sensing in bacteria. *Rev Biotechnol Biochem* 2020; 1(1):002. URL: <https://asteroidpublishers.com/uploads/articlepdfs/RBB-00223369.pdf>.

## PROSPECTS FOR EXPANDING THE RANGE OF BACTERIAL STRAINS-COMPONENTS OF PLANT PROTECTION MEANS OF BIOLOGICAL ORIGIN

N.S. LYAKHOVCHENKO, V.Yu. SENCHENKOV, I.A. NIKISHIN, I.P. SOLYANIKOVA

*Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education,  
Belgorod National Research University, Belgorod*

The purpose of this work was to create a working collection to analyze the prospects for expanding the range of antagonist strains of pathogens. The antagonistic activity of the extracted isolates against some phytopathogens was assessed. It has been shown that the isolated strains of microorganisms with antagonistic activity from the Vezelka River and the soil of the Belgorod region have a biotechnological potential in the development of plant protection products of biological origin. For example, a number of strains have been isolated that have antibacterial and antifungal properties.

*Keywords:* bacterial strains, biological plant protection products, research prospects.

### Address:

Lyakhovchenko N.S.  
postgraduate student, Belgorod State National Research University  
E-mail: lyakhovchenko@bsu.edu.ru

### Для цитирования:

Ляховченко Н.С., Сенченков В.Ю., Никишин И.А., Соляникова И.П. Перспективы расширения ассортимента бактериальных штаммов-компонентов средств защиты растений биологического происхождения. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(4):103–106.

### For citation:

Lyakhovchenko N.S., Senchenkov V.Yu., Nikishin I.A., Solyanikova I.P. Prospects for expanding the range of bacterial strains-components of plant protection means of biological origin. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2022; 18(4):103–106 (in Russian).

# ПИЩЕВАЯ ЦЕННОСТЬ СЪЕДОБНЫХ ГРИБОВ В АСПЕКТЕ СТЕПЕНИ ПЕРЕВАРИВАЕМОСТИ ИХ БЕЛКОВ И РАЗВИТИЕ МЕТОДОВ ИЗУЧЕНИЯ ПЕРЕВАРИВАЕМОСТИ БЕЛКОВ

А.Н. РАЗИН<sup>1\*</sup>, М.Ю. ВОЛКОВ<sup>2</sup>, А.В. ГАРАБАДЖИУ<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Научно-производственное объединение «Биолукс», Санкт-Петербург;

<sup>2</sup> МВА имени К.И. Скрябина: ФГБОУ ВО МГАВМиБ, Москва;

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет)

Определены способы выражения оценки ценности грибов как важного источника белка. Проведено исследование по изучению степени перевариваемости белков съедобных грибов с использованием запатентованного метода на базе организации, занимающейся производством биологически активных добавок. Выявлены достоинства и недостатки использованного метода. Разработан улучшенный метод изучения степени перевариваемости белков грибов с использованием капиллярного электрофореза. Для учета процесса кинетики предложен способ математического моделирования.

**Ключевые слова:** грибы, аминокислотный состав, степень усвояемости белка, кинетика процесса ферментативного гидролиза, капиллярный электрофорез.

## Введение

В настоящий момент грибы признаны наукой ценными источниками белка. Для них определили коэффициент усвоения (КУ) белка человеком для большинства видов. КУ — это отношение суммы концентраций аминокислот в исследуемом белке к аналогичной величине для «идеального» белка. Величина получается усредненной по отношению к составу белка организма человека или животного. Для грибов КУ человеком составляет примерно 70%. В качестве величины сравнения принят КУ человеком лучших сортов мяса, равный 100% [3].

Известны труды австралийских ученых по определению КУ многих видов грибов для животных [10]. Представлен также фундаментальный литературный обзор понутрицевитической ценности грибов, где другой группой австралийских ученых исчерпывающе описаны актуальность темы и исследования по степени перевариваемости грибов [9].

Определение ценности белков любых продуктов базируется на оценке аминокислотного состава,

который выражают через КУ, и степени усвояемости белка животным организмом, которая складывается из степени всасываемости белков в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) и степени перевариваемости белка ферментами пищеварительного тракта [5]. Обе величины дают оценку качества белка как источника необходимых для биосинтеза аминокислот.

Ценность величины КУ относительна, так как пища человека и любых существ очень разнообразна, а аминокислоты используются ими не только для синтеза белков. Поэтому на первый план выходит определение степени усвояемости белка для грибов, которая никем ранее не исследовалась. В этой области проведены единичные работы с целью сравнения технологий культивации вешенки, выращенной разным образом для коров [8]. Исследования, изучающие перевариваемость белка в условиях, близких к условиям ЖКТ человека и животных, отсутствуют.

## Методы

Выполнено исследование по определению степени перевариваемости белков одиннадцати съедобных грибов, имеющих также лечебно-профилактическую ценность, то есть грибов, плодовые тела которых имеют макроскопические размеры [4].

Объект исследования — 15 образцов субстанций грибов, свежих и сушеных плодовых тел. Дополнительно изучен препарат порошка мицелия гриба Весёлка

обыкновенная, культивируемого методом глубинного погружения и используемого как основа одного из БАД.

Исследование включало в себя несколько этапов:

1. Варка грибов способом, аналогичным обычным манипуляциям при приготовлении из них пищи.

2. Использование метода патента Российской Федерации «Способ определения перевариваемости белков пищевых продуктов *in vitro*» № 2045918 от 1995 г., подразумевающий двухстадийный гидролиз изучаемых белков в условиях, близких к естественным, где первая фаза включает ферментацию трипсином, вторая — пепсином [7].

3. Оценка степени перевариваемости, которая вычисляется отношением количества образовавшегося свободного тирозина к общему количеству тирозина в исходном белке при полном его гидролизе в жестких условиях в соляной кислоте; при этом тирозин определяется спектрофотометрией проб.

Дополнительно определен общий белок грибов в 100 г продукта, умноженный на КУ и степень перевариваемости.

### Результаты и обсуждение

1. *Интерпретация итогов исследования.* Степень перевариваемости белков грибов составила 72–78%. Полученное значение выше, чем степень перевариваемости белка костного бульона (69%), но ниже, чем говядины 1-й категории (88%). Общий белок грибов в 100 г продукта оказался сравнимым для сухих грибов (10,4–18,9 г/100 г) с аналогичной цифрой для говядины 1-й категории (17,6 г/100 г) продукта.

2. *Достоинства и недостатки использованного метода.* Метод прост и удобен в исполнении, но остается неясным аминокислотный состав; кроме того, анализ неточен. Неточность выражается в том, что спектрофотометрическое определение концентраций тирозина смазывается поглощением этой аминокислоты в оставшихся белках и рядом иных факторов. Кроме этого, практически полностью отсутствует возможность изучения кинетики процесса ферментативного гидролиза, так как отбор пробы для стандартных спектрофотометров подразумевает большое количество от общего исследуемого объема.

Между тем аспект кинетики — важный элемент. В белках есть гидрофобные кластеры, которые не гидролизуются без предварительной их демаскировки благодаря разрушению соседних по отношению к ним аминокислотных цепей. Это приводит к немонотонности кинетики гидролиза. Подобные эффекты изучены в диссертации Воробьева М.М. и иных его работах [1]. Благодаря Воробьеву М.М. и его коллегам с помощью

современных методов физической химии изучен протеолиз белков и получены константы диссоциации и демаскировки всех пар пептидных связей. Также был создан аппарат математического моделирования кинетики белков с оригинальным преобразованием системы дифференциальных уравнений Михаэлиса — Ментен, что реализовано в программе PROTEOLIS [2].

3. *Улучшение методики и развитие темы.* Для полноценного изучения перевариваемости грибов необходим подход с учетом гидрофобных кластеров. Об этом свидетельствует и название одной из типичной для грибов группы белков — гидрофобные.

Применение метода капиллярного электрофореза (КЭ) позволит рассмотреть вопросы изучения степени перевариваемости белков грибов на новом уровне. КЭ — физический метод анализа, основанный на миграции внутри капилляра заряженных частиц определяемых веществ, растворенных в растворе электролита, под влиянием постоянного электрического поля [6]. Данный метод дешевле, быстрее и точнее, по сравнению с любыми другими видами хроматографии. Фронт электроосмоса не размывается, в отличие от фронта элюирования, и принципиально можно достигнуть любой чувствительности, которая зависит от длины капилляра. В отношении анализа аминокислотного состава методы КЭ пока мало применялись, хотя подобные работы встречаются, например, в работах иностранных исследователей [9].

В настоящий момент на базе лаборатории капиллярного электрофореза Института аналитического приборостроения начаты работы по совершенствованию метода. КЭ позволит отслеживать динамику всех промежуточных продуктов гидролиза.

### Заключение

Таким образом, проведено исследование по определению степени усвояемости белка для грибов, которое позволило получить и проанализировать определенные результаты. Выявлены достоинства и недостатки использованной в исследовании методики. Для устранения недочетов предложен улучшенный метод изучения перевариваемости степени грибов, такой как капиллярный электрофорез. Метод характеризуется большей точностью, в связи с чем дает возможность оценить кинетику всех промежуточных продуктов гидролиза.

#### Выводы:

- Определение ценности белков любых продуктов базируется на оценке аминокислотного состава, который выражают через коэффициент усвоения белка,

и степени усвояемости белка животным организмом, суммирующейся из степени всасываемости белков в желудочно-кишечном тракте и степени переваримости белка ферментами пищеварительного тракта.

- Выполнено исследование по определению степени перевариваемости белков одиннадцати съедобных грибов. Использован метод патента Российской Федерации «Способ определения переваримости белков пищевых продуктов *in vitro*» №: 2045918 от 1995 г. Полученная величина составила 72–78%.

- Определен общий белок грибов в 100 г продукта, умноженный на коэффициент усвояемости белка и степень перевариваемости. Полученная величина сравнима для сухих грибов (10,4–18,9 г/100) с аналогичной цифрой для говядины 1-й категории (17,6 г/100 г) продукта.

- Метод «Способ определения переваримости белков пищевых продуктов *in vitro*» №: 2045918 от 1995 г. прост и удобен, но при его применении остается неясным аминокислотный состав: кроме того, анализ неточен. Неточность заключается в смазывании искомым концентраций тирозина при спектрофотометрическом определении и отсутствием возможности изучения кинетики процесса ферментативного гидролиза.

- Применение метода капиллярного электрофореза для определения степени перевариваемости белков грибов позволяет повысить точность результатов, то есть дает возможность оценить кинетику всех промежуточных продуктов гидролиза при исследовании данного процесса. Метод также обладает доступной стоимостью и характеризуется быстротой исполнения.

## Литература

1. Воробьев М.М. Кинетика ферментативного гидролиза полипептидов и гидрофобные эффекты. Автореферат диссертации. — М.: Физ. Хим. 2009. — 46 с.
2. Воробьев М.М. Презентация исследований протеолиза. 2016 [Электронный ресурс] / Лаборатория химической кинетики и спектральных методов изучения гидратации биополимеров — Режим доступа: <http://polly.phys.msu.ru/ru/labs/Vorobyev/presentation.pdf> (свободный доступ).
3. Лисицын А.Б., Никитина М.А., Сусь Е.Б. Оценка качества белка с использованием компьютерных технологий // Пищевая промышленность. — 2016. — № 1. — С. 26–29.
4. Павлова М., Сурков В. Экологические группы грибов // Биология. — 2000. — № 29(564). [Электронный ресурс] — Режим доступа: <https://bio.1sept.ru/article.php?ID=200002901> (Дата обращения: 14.07.2017).

5. Степанов К.В., Пирогов А.В., Дикунец М.А., Шпигун О.А. Получение фенилтиогидантоинов аминокислот для количественного анализа аминокислотного состава белков методом капиллярного электрофореза // Вестн. Моск. Унта. Сер. 2 Хим. — 2005. — Т. 46. — № 6. — С. 395–399.
6. Хомов Ю.А., Фомин А.Н. Капиллярный электрофорез как высокоэффективный аналитический метод // Современные проблемы науки и образования. — 2012. — № 5. — С. 349.
7. Юдина С.Б., Липатов Н.Н. Патент на изобретение «Способ определения перевариваемости белков пищевых продуктов *in vitro*». Патентообладатель: Московский институт прикладной биотехнологии, 1995. № 2045918.
8. Nasrin Hadizadeh, Kheiri F., Shakeri P. Evaluation the nutritional value and digestibility of rice straw enriched by Oyster Mushroom (*Pleurotus florida*) // CIBTech Journal of Zoology. — 2015. — Vol. 4(2). — P. 76–82.
9. Roupas P., Krause D., Taylor P. Mushrooms and Health 2014: Clinical and nutritional studies in humans. Report by CSIRO Food and Health Flagship Australia (2014). URL: [https://db.iseki-food.net/sites/default/files/digital\\_library\\_attachments/FINAL\\_Mushrooms\\_and\\_Health.pdf](https://db.iseki-food.net/sites/default/files/digital_library_attachments/FINAL_Mushrooms_and_Health.pdf).
10. Wallis I.R., Claridge A.W., Trappe J.M. Nitrogen content, amino acid composition and digestibility of fungi from a nutritional perspective in animal mycophagy // Fungal biology. — 2012. — Vol. 116. — P. 590–602.

## References

1. Vorob'yev MM. Kinetika fermentativnogo gidroliza polipeptidov i gidrofobnyye efekty. Avtoreferat dissertatsii. Moscow: Fiz. Khim. 2009: 46 (in Russian).
2. Vorob'yev MM. Prezentatsiya issledovaniy proteoliza. / Laboratoriya khimicheskoy kinetiki i spektral'nykh metodov izucheniya gidratsii biopolimerov, 2016; URL: <http://polly.phys.msu.ru/ru/labs/Vorobyev/presentation.pdf> (in Russian).
3. Lisitsyn AB, Nikitina MA, Sus' YeB. Otsenka kachestva belka s ispol'zovaniyem komp'yuternykh tekhnologiy. Pishchevaya promyshlennost' 2016; 1:26–29 (in Russian).
4. Pavlova M, Surkov V. Ekologicheskiye gruppy gribov. Biologiya 2000; 29(564). URL: <https://bio.1sept.ru/article.php?ID=200002901> (Data obrashcheniya: 14.07.2017) (in Russian).
5. Stepanov KV, Pirogov AV, Dikunets MA, Shpigun OA. Polucheniye feniltiogidantoinov aminokislot dlya kolichestvennogo analiza aminokislalnogo sostava belkov metodom kapillyarnogo elektroforeza. Vestn Mosk Un-ta. Ser 2 Khim 2005; 46(6):395–399 (in Russian).
6. Khomov YuA, Fomin AN. Kapillyarnyy elektroforez kak vysokoeffektivnyy analiticheskiy metod. Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya 2012; 5:349 (in Russian).
7. Yudina SB, Lipatov NN. Patent na izobreteniyе «Sposob opredeleniya perevarivayemosti belkov pishchevykh produktov

- in vitro». Patentoobladatel': Moskovskiy institut prikladnoy biotekhnologii, 1995. № 2045918 (in Russian).
8. Nasrin Hadizadeh, Kheiri F, Shakeri P. Evaluation the nutritional value and digestibility of rice straw enriched by Oyster Mushroom (*Pleurotus florida*). CIBTech Journal of Zoology 2015; 4(2):76–82.
  9. Roupas P, Krause D, Taylor P. Mushrooms and Health 2014: Clinical and nutritional studies in humans. Report by CSIRO Food and Health Flagship Australia (2014). URL: [https://db.iseki-food.net/sites/default/files/digital\\_library\\_attachments/FINAL\\_Mushrooms\\_and\\_Health.pdf](https://db.iseki-food.net/sites/default/files/digital_library_attachments/FINAL_Mushrooms_and_Health.pdf).
  10. Wallis IR, Claridge AW, Trappe JM. Nitrogen content, amino acid composition and digestibility of fungi from a nutritional perspective in animal mycophagy. Fungal biology 2012; 116:590–602.

## NUTRITIONAL VALUE OF EDIBLE MUSHROOMS IN TERMS OF THE DEGREE OF DIGESTIBILITY OF THEIR PROTEINS AND DEVELOPMENT OF METHODS FOR STUDYING PROTEIN DIGESTIBILITY

A.N. RAZIN<sup>1</sup>, M. Yu. VOLKOV<sup>2</sup>, A.V. GARABAGIU<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Biolux Research and Production Association, St. Petersburg;*

<sup>2</sup> *MBA named after K.I. Scriabin: FGBOU VO MGAVMiB, Moscow;*

<sup>3</sup> *St. Petersburg State Technological Institute (Technical University)*

The ways of expressing the evaluation of the value of mushrooms as an important source of protein are determined. A study was conducted to study the degree of digestibility of edible mushroom proteins using a patented method on the basis of an organization engaged in the production of dietary supplements. The advantages and disadvantages of the method used are revealed. An improved method has been developed for studying the degree of digestibility of fungal proteins using capillary electrophoresis. To take into account the process of kinetics, a method of mathematical modeling is proposed.

*Keywords:* fungi, amino acid composition, degree of protein digestibility, kinetics of enzymatic hydrolysis, capillary electrophoresis.

### Address:

Razin A.N., Ph.D.

chief biotechnologist, Research and Production Association «Biolux»

E-mail: razin.biolux@bk.ru

### Для цитирования:

Разин А.Н., Волков М.Ю., Гарабаджиу А.В. Пищевая ценность съедобных грибов в аспекте степени перевариваемости их белков и развитие методов изучения перевариваемости белков. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(4):107–110.

### For citation:

Razin A.N., Volkov M. Yu., Garabagiu A.V. Nutritional value of edible mushrooms in terms of the degree of digestibility of their proteins and development of methods for studying protein digestibility. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(4):107–110 (in Russian).

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

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

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



Подписано к печати 28.12.2022  
Формат 60/90<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага офсетная № 1.  
Печать офсетная. Гарнитура Академия.  
Печ. л. 7,0. Тираж 1000 экз.

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