

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

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

Редакционный совет

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

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

Зав. редакцией О.В. Коломбет

Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр

медико-социальных проблем»

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

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

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

Scientific and practical journal

Founded in 2005

Chief editor

R.G. Vasilov

Editorial board

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

Editorial council

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

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

Head edited by O.V. Colombet

Address: 123060, Moscow, PO Box 3

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

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

Founder and Publisher:

ANO «Information and Analytical Center
medical and social problems»

Address: 127581 Moscow, 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. Васильев 5

Оригинальные статьи

Цитотоксическое действие лектиноподобных белков *Cuscuta europaе* на клетки крови и кожи.

Э.С. Хашимова, К.А. Кахарова, М.К. Салахутдинова,
М.А. Каланова, Ю.И. Ощепкова, Ш.И. Салихов 7

Изучение причины повышения антибактериальной активности бензилпенициллина натриевой соли после обработки импульсным магнитным полем высокой напряженности.

А.В. Богданов, Н.А. Роденко, В.А. Глушников, В.А. Жукова, Т.И. Васильева 12

Генетическое разнообразие штаммов *Francisella tularensis subspecies mediasiatica*.

В.М. Сорокин, Н.В. Павлович, М.В. Цимбалистова, А.С. Водопьянов,
Р.В. Писанов, Г.Х. Базарова, Е.Н. Рождественский, А.К. Носков 21

Оценка качества кормовых добавок на основе дрожжей рода *Rhodotorula*, предназначенных для выращивания объектов аквакультуры.

Е.М. Панчишина, Н.Л. Корниенко 28

Анализ штаммов *Salmonella enterica* spp., изолированных в Ростовской области в 2022 году.

А.М. Горох, А.А. Герасименко, С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов 35

Иммунохимическая характеристика моноклональных антител к вирусу Западного Нила.

А.В. Елхова, Е.В. Пименова, А.Ю. Мачнева, Т.В. Замарина,
А.Т. Яковлев, И.В. Новицкая 42

Анализ качества вакцины холерной бивалентной химической, выпущенной с 2013 по 2023 годы.

О.А. Лобовикова, И.В. Шульгина, О.А. Волох, А.А. Савенкова, О.В. Громова,
С.А. Воробьева, А.С. Феськова, Л.В. Зайцева, С.С. Галетова, А.К. Никифоров 48

Особенности взаимодействия экзоинулиназы из *Kluyveromyces marxianus* с моно- и полисахаридами.

С.М. Макин, А.Н. Дубовицкая, Д.Ю. Богомоллов, М.С. Кондратьев, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов 56

Разработка диагностических препаратов и методических приемов для детекции *Yersinia pestis* (капсульной и бескапсульной форм).

А.А. Семирчева, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, Д.В. Русанова,
Ю.Ю. Гаркуша, Е.В. Жданова, И.В. Жарникова 65

Поиск В-зависимых эпитопов S белка вируса инфекционного бронхита кур, оптимальных для разработки штамм-специфичных рекомбинантных вакцин.

Ф. Ян, А.С. Кильп, Т.Е. Миронова, К.В. Ан, В.Н. Афонюшкин, В.Ю. Коптев 70

Обзоры

Технические решения для создания лабораторной установки перфузионной фильтрации.
О.О. Сокол, Ю. Мехда 78

Лекарственные средства с противовирусной активностью в профилактике и лечении клещевого энцефалита.

А.С. Понамарева, А.Ю. Петров 84

Электропроводящие полимерные материалы для тканевой инженерии.

Д.А. Кириллова, П.М. Готовцев, Р.Г. Васильев 91

Страницы истории. К 125-летию со дня рождения Э.В. Ермольевой (1898–1974) 101

Правила для авторов 103

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. R.G. Vasilov 5

Original articles

Cytotoxic effect of *Cuscuta europaea* lectin-like proteins on blood and skin cells.

Z.S. Khashimova, K.A. Kakhorova, M.K. Salakhutdinova,

M.A. Kalanova, Yu.I. Oshchepkova, Sh.I. Salihov 7

Study of reasons of the increase in the antibacterial activity of benzylpenicillin sodium salt after processing it with a high-intensity pulsed magnetic field.

A.V. Bogdanov, N.A. Rodenko, V.A. Glushchenkov, V.A. Zhukova, T.I. Vasilyeva 12

Genetic diversity of *Francisella tularensis* subspecies *mediasiatica*.

V.M. Sorokin, N.V. Pavlovich, M.V. Tsimbalistova, A.S. Vodopyanov,

R.V. Pisanov, G.Kh. Bazarova, E.N. Rozhdestvensky, A.K. Noskov 21

Evaluation of the quality feed additives based on yeast genus *Rhodotorula* intended for the cultivation of aquaculture facilities.

E.M. Panchishina, N.L. Kornienko 28

Analysis of *Salmonella enterica* spp. strains, isolated in Rostov region in 2022.

A.M. Gorokh, A.A. Gerasimenko, S.O. Vodopyanov, A.S. Vodopyanov 35

Immunochemical characterization of monoclonal antibodies to West Nile virus.

A.V. Elkhova, E.V. Pimenova, A.U. Machneva, T.V. Zamarina,

A.T. Yakovlev, I.V. Novitskaya 42

Quality analysis of *Cholera* bivalent chemical vaccine, issued from 2013 to 2023.

O.A. Lobovikova, I.V. Shulgina, O.A. Volokh, A.A. Savenkova, O.V. Gromova,

S.A. Vorobyova, A.S. Feskova, L.V. Zaitseva, S.S. Galetova, A.K. Nikiforov 48

Features of the interaction of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* with mono- and polysaccharides.

S.M. Makin, A.N. Dubovitskaya, D.Yu. Bogomolov, M.S. Kondratyev,

M.G. Holyavka, V.G. Artyukhov 56

Development of diagnostic drugs and methodological approaches for the detection of *Yersinia pestis* (capsule and capsule-free forms).

A.A. Semircheva, I.S. Tyumentseva, E.N. Afanasyev, D.V. Rusanova,

Yu.Yu. Garkusha, E.V. Zhdanova, I.V. Zharnikova 65

Search for B-dependent epitopes of the viral S protein infectious bronchitis of chickens, optimal for the development of strain-specific recombinant vaccines.

F. Yan, A.S. Kilp, T.E. Mironova, K.V. An, V.N. Afonyushkin, V.Yu. Koptev 70

Reviews

Technical solutions for creating a laboratory perfusion filtration units.

O.O. Sokol, Y. Mehda 78

Medicines with antiviral activity in the prevention and treatment of tick-borne encephalitis.

A.S. Ponamareva, A.Yu. Petrov 84

Electroconductive polymeric materials for tissue engineering.

D.A. Kirillova, P.M. Gotovtsev, R.G. Vasilov 91

Pages of history. To the 125th anniversary of the birth of Z.V. Ermolyeva (1898–1974) 101

Rules for authors 103

К читателям

В четвертом номере журнала подобраны в основном оригинальные статьи. В работе Хашимовой З.С. с коллегами «Цитотоксическое действие лектиноподобных белков (ЛПБ) *Cuscuta europea* на клетки крови и кожи» из Института биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз, (Ташкент, Республика Узбекистан) установлено выраженное цитотоксическое действие ЛПБ на эти клетки и клетки крови, включая лимфоциты.

В статье Богданова А.В. и др. «Изучение причины повышения антибактериальной активности бензилпенициллина натриевой соли после обработки импульсным магнитным полем высокой напряженности» (Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова. Обособленное структурное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр» Казанский научный центр РАН», Казань; ФГБУН Самарский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Самара; ФГАОУ ВО Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева, Самара) описан факт повышения антибактериальной активности бензилпенициллина натриевой соли после ее обработки импульсным магнитным полем (ИМП). Установлено изменение величин химических сдвигов (δ_H) и констант спин-спинового взаимодействия ($^2J_{HH}$) сигналов метиленовых протонов бензильного заместителя в результате воздействия ИМП.

В исследовании Сорокина В.М. и др. «Генетическое разнообразие штаммов *Francisella tularensis* подвида *mediasiatica*» (ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону; ФКУЗ Алтайская ПЧС Роспотребнадзора, Горно-Алтайск) выявлена высокая степень генетического разнообразия штаммов подвида *mediasiatica*, что ранее было затруднительно из-за небольшого количества доступных штаммов этого подвида.

В работе Е.М. Панчишиной, Н.Л. Корниенко «Оценка качества кормовых добавок на основе дрожжей рода *Rhodotorula*, предназначенных для выращивания объектов аквакультуры», из ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет» (Владивосток) исследование морфологических признаков при микроскопировании жидкой кормовой добавки позволило установить фактическое содержание живых дрожжевых клеток, что свидетельствует об её пробиотической направленности. Биотестирование с помощью тест-культуры *Tetrahymena pyriformis* показало высокую биологическую ценность кормовых добавок и отсутствие их токсичности.

Группа исследователей (Горох А.М. и др.) из ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону проанализировала генетические особенности штаммов *Salmonella enterica*, выделенных в Ростовской области в 2022 году из клинического материала и продуктов питания. Для большинства штаммов существует четкая корреляция между ST-типом и серотипом. Проведенные INDEL- и филогенетический анализы выявили 5 уникальных генотипов, коррелирующих с определенными серотипами.

Сотрудники ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Елхова А.В. и др. определяли иммуноцитохимические характеристики моноклональных антител (МКА) к вирусу Западного Нила (ВЗН). МКА были охарактеризованы в методе иммунодиффузии в геле и в иммуноферментном анализе (ИФА) для определения специфичности. Антигенные белковые фракции ВЗН были изучены методом электрофореза в полиакриламидном геле. Результаты иммунохимической характеристики МКА свидетельствуют об их специфичном связывании с антигенами ВЗН.

Саратовские исследователи (Лобовикова О.А. и др. из ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова) осуществили анализ качества вакцины холерной бивалентной химической, выпущенной с 2013 по 2023 годы. Ретроспективный анализ качества указанного лекарственного препарата свидетельствует о стабильности технологического процесса и соответствии продукции требованиям нормативной документации по результатам контроля производителя и испытательных лабораторий.

Комплексный коллектив сотрудников учреждений из Воронежа, Пушино и Севастополя (Макин С.М. и др.) изучал изменения пространственной структуры молекулы экзоинулиназы из *Kluveromyces marxianus* в процессе ее взаимодействия с моно- и полисахаридами. Проанализированы изменения в объеме и числе внутренних структур в процессе связывания инулиназы с моно- (глюкоза, фруктоза) и полисахаридными (инулин) соединениями. Описаны

трансформации в числе и длине туннелей и пор, а также реорганизация состава и локализации групп заряженных и гидрофобных аминокислот на поверхности фермента.

Ученые Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора (Семирчева А.А. и др.) выполнили исследование «Разработка диагностических препаратов и методических приёмов для детекции *Yersinia pestis* (капсульной и бескапсульной форм)», в котором подтверждена эффективность использования чумного иммуномагнитного сорбента, обеспечивающего селективное концентрирование материала с низким содержанием патогена и очистку проб от возможной контаминации посторонней микрофлорой в лабораторных и полевых условиях. Предложенный способ пробоподготовки образцов окружающей среды применим при осуществлении обследования на наличие возбудителя чумы капсульной и бескапсульной форм разнообразных потенциально инфицированных объектов биотической (животные и эктопаразиты, вовлеченные в чумной цикл) и абиотической природы в конкретных очагах.

Новосибирские исследователи (Ян Ф. и др.), объединившись, провели комплексное исследование «Поиск В-зависимых эпитопов S белка вируса инфекционного бронхита кур, оптимальных для разработки штамм-специфичных рекомбинантных вакцин». Были применены методы биоинформатики для анализа В-клеточных антигенных эпитопов белков S1. Такой анализ позволяет теоретически исследовать их способность противостоять IBV и клонировать их в плазмиду pBE-S для подтверждения их иммунной активности на живых моделях. Полученные данные могут быть использованы для создания рекомбинантных вакцин на основе энтероинвазивных бактерий, с целью праймирования штамм-специфичными протективными антигенами, перед применением классических более иммуногенных вакцин.

Кроме 10 оригинальных статей, помещены три обзора по следующей тематике. Так, в обзорной статье «Технические решения для создания лабораторной установки перфузионной фильтрации» (Сокол О.О., Мехда Ю., Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, г/о Лосино-Петровский, Московской обл.) описываются технические решения, реализованные в лабораторной системе перфузионной фильтрации для непрерывного культивирования культур клеток. Рассмотрены элементы системы и их технические характеристики. Приведенное описание позволяет получить общее представление о технических особенностях реализации данного типа оборудования для процессов культивирования в лабораторном масштабе.

В обзоре «Лекарственные средства с противовирусной активностью в профилактике и лечении клещевого энцефалита» (Понамарева А.С., Петров А.Ю., Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург) проанализированы лекарственные средства для профилактики и лечения клещевого энцефалита противовирусными средствами синтетического и растительного происхождения: Риамиловир (Триазавирин), Йодофеназон (Йодантипирином), Рибавирин (Рибавирин), Фавипиравир (Коронавир, Алепривир), Меглюмина акридонацетат (Циклоферон), Полисахариды побегов *Solanum tuberosum* (Панавир), 7-деаза-2-С-метиладенозин. Рассмотрены виды лекарственных форм, используемых для терапии клещевого энцефалита и их эффективность.

Обзор Кирилловой Д.А., Готовцева П.М., Василова Р.Г. (Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Московский физико-технический институт — Национальный исследовательский университет, Москва) посвящен электропроводящим полимерным материалам для тканевой инженерии. В нем обобщены данные об электропроводящих материалах для медицинских применений, включая проводящие гидрогели и проводящие композитные пористые матрицы, используемые в инженерии костной, мышечной, сердечной и нервной тканей.

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

ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЛЕКТИНОПОДОБНЫХ БЕЛКОВ *CUSCUTA EUROPAEA* НА КЛЕТКИ КРОВИ И КОЖИ

Э.С. ХАШИМОВА*, К.А. КАХАРОВА, М.К. САЛАХУТДИНОВА,
М.А. КАЛАНОВА, Ю.И. ОЩЕПКОВА, Ш.И. САЛИХОВ

Институт биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз, Ташкент, Республика Узбекистан

В работе приведены данные о цитотоксическом действии лектиноподобных белков (ЛПБ) *Cuscuta europaea*, произрастающих на янтате (*Alhagi*), на клетках В-16 (рак кожи) и клетках крови. Установлено выраженное цитотоксическое действие ЛПБ на эти клетки и клетки крови, включая лимфоциты.

Ключевые слова: лектиноподобные белки, культуры клеток В-16, лейкозные клетки, цитотоксичность, МТТ.

Введение

Проблема злокачественных новообразований, которые относятся к группе социально значимых заболеваний, является одной из серьезнейших и актуальных проблем не только медицины, но и фармацевтики, которая занимается поиском эффективных средств борьбы с ними. Несмотря на огромный арсенал методов и средств для лечения онкологических больных, химиотерапия остается основной частью лечения данного заболевания. Однако многие противоопухолевые лекарственные препараты оказались неэффективными вследствие развития устойчивости опухоли к лекарственной терапии. С другой стороны, многие препараты токсичны, дают побочные эффекты, то есть плохо всасываются, поражают жизненно важные органы организма. Поэтому одной из проблем химиотерапии является поиск эффективных противоопухолевых лекарственных препаратов, обладающих свойствами преодолевать множественную лекарственную устойчивость с целью создания более совершенных схем лечения злокачественных новообразований.

В последнее время перспективным подходом к решению проблем химиотерапии стала синергетическая комбинированная терапия, которая может преодолеть резистентность к терапии и даст возможность снизить дозировку химиопрепаратов [5, 6, 9].

В этой связи актуальной является альтернативная терапия рака, включая клетки крови, которая как оказалось, во многом сходна с действием современных таргетных препаратов, в сочетании с конвенциональными противоопухолевыми лекарственными средствами [12]. Яркими примерами являются препараты, получаемые из омелы белой в виде экстрактов, их отдельных компонентов (лектины), а также в виде рекомбинантного препарата, в частности, водный экстракт, стандартизованный по лектину ML-1 под названием «Искадор», который применяется в качестве альтернативной терапии раковых заболеваний [13].

Эффективность сочетания лектинов в комбинации с конвенциональными цитостатиками свидетельствует о перспективности использования конвенциональных противоопухолевых препаратов с цитотоксическими лектинами при кожных заболеваниях (меланомы).

Среди паразитирующих растений большой интерес вызывает повилика (*Cuscuta*) [11]. Наш интерес к повилике обусловлен необходимостью в высокоактивном цитотоксическом веществе, эффективном против раковых клеток, включая псориаз [10], для дальнейшего создания опухоли-адресованного терапевтического средства.

Целью данной работы является изучение действия лектинов *Cuscuta europaea* на клетки крови и клетки кожи В-16 (рак кожи).

Материалы и методы

В качестве растительного сырья использовали зрелые семена повилики (*Cuscuta europaea*), произрастающие на янтате (*Alhagi*).

Ранее нами были выделены лектиноподобные белки *Cuscuta europaea*, произрастающих на садовых

© 2023 г. Хашимова Э.С., Кахарова К.А., Салахутдинова М.К., Каланова М.А., Ощепкова Ю.И., Салихов Ш.И.

* **Автор для переписки:**

Хашимова Зайнат Саггаровна

доктор биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории химии белков и пептидов, Институт биоорганической химии им. академика А.С. Садыкова АН РУз

E-mail: zaynat_Kh@mail.ru

культурах и луговых травах, посредством ступенчатого высаливания сульфатом аммония и охарактеризованы биохимическими методами [4]. Изучено цитотоксическое действие ЛПБ *Cuscuta europaea* на разных линиях культуры раковых клеток [1, 3, 8].

Получение лимфоцитов

Лимфоциты выделяли по стандартной методике, используя градиент фиколл-гипак с некоторыми модификациями [2]. Для этого брали стабилизированную гепарином свежесыворотную венозную кровь доноров. Затем разбавляли кровь равным объемом средой RPMI-1640 в соотношении 1:1 при комнатной температуре. С помощью пипетки аккуратно наслаивали разбавленную кровь на градиент фиколл-гипак, затем центрифугировали при 4500 об/мин в течение 30 мин при комнатной температуре. Слои лимфоцитов осторожно собирали по всей площади сечения пробирки, переносили в чистую сухую центрифужную пробирку и разбавляли средой RPMI в соотношении 1:5. Содержимое пробирки центрифугировали 10 мин при 4500 об/мин. Отмывали 2 раза. Полученный осадок ресуспендировали в среде RPMI 1640, содержащей 200 мМ глутамин, 10% телячьей эмбриональной сыворотки, антибиотик и антимикотик и использовали для изучения цитотоксической активности лектинов.

Кровь с лейкозными клетками брали у больного 6-летнего ребенка. Лейкозные клетки получали с помощью градиента фиколл-гипак, как описано выше.

Цитотоксичность оценивали биохимически с помощью МТТ-метода и подсчета живых клеток.

Результаты и обсуждение

Лектиноподобные белки выделяли из повилики, паразитирующей на верблюжьей колючке (янтак, по

лат. *Alhagi*). Янтак относится к семейству бобовых, произрастает в пустынях и представляет собой колючий полукустарник с глубоко проникающей корневой системой. В траве содержатся флавоноиды, сапонины, сахара, дубильные вещества, витамины С, К и группы В, каротин, урсоловая кислота и др. Он широко используется в народной медицине [7].

Клеточные линии, полученные из опухолей, являются наиболее часто используемыми моделями и позволяют лучше понять молекулярные механизмы различных опухолей, что весьма перспективно для разработки эффективных стратегий лечения. С другой стороны, клеточные линии, включая клетки крови, по-разному чувствительны к одним и тем же биологически активным веществам, которые могут быть введены в заданной концентрации и в течение заданного периода времени, что является весьма удобной клеточной моделью. Так, острый лимфобластный лейкоз, злокачественное новообразование, происходящее из В- или Т-клеток-предшественников, является наиболее распространенным лейкозом у детей, на его долю приходится примерно 80% всех лейкозов у детей [7].

В связи с этим была поставлена задача исследования биологической активности лектиноподобных белков *Cuscuta europaea* на клетках крови, включая лейкозные.

Лимфоциты и лейкозные клетки, полученные от 5–6-летнего больного лейкозом ребёнка, выделены центрифугированием в градиенте фиколл-гипака, как описано в материалах и методах.

Цитотоксичность оценивали биохимически с помощью МТТ-метода и подсчета живых клеток как описано в работах [1, 2, 8].

Полученные данные приведены в таблице 1.

Таблица 1

Сравнительный анализ белковых фракций повилики

Фракции	Подавление включения МТТ в клетки, %							
	U937		Лимфоциты		Лейкозные клетки (24 часа)		Лейкозные клетки (48 часов)	
	100μ/мл	10μ/мл	100μ/мл	10μ/мл	100μ/мл	10μ/мл	100μ/мл	10μ/мл
ЛПБ ₂₀	86±0,1	64±0,5	85±0,1	48±0,7	61±0,4	46±0,2	83±0,3	62±0,2
ЛПБ ₅₀	93±0,5	76±0,4	98±0,2	67±0,4	69±0,3	48±0,1	90±0,4	57±0,4
Цисплатин	87±0,3	47±0,4	63±0,1	42±0,6	62,5±0,4	47±0,5	82±0,3	52±0,2

Примечание: достоверное отличие от контроля $p < 0,05$

Контролем служили клетки без воздействия веществ, где уровень включения МТТ в клетки был 100% (0% подавления). Цисплатин взят нами в качестве положительного контроля, указывающего на чувствительность клеток к воздействию препаратов.

Как видно из данных таблицы 1, в культуре клеток лейкемической моноцитарной лимфомы человека U937 обе фракции лектиноподобных белков проявляют цитотоксическую активность. Так, цитотоксичность ЛПБ₂₀ составляет 86 и 64% при дозах 100 мкм/мл и 10 мкм/мл, соответственно. Более выраженную цитотоксическую активность проявляет ЛПБ₅₀ — 93 и 76% при дозах 100 мкм/мл и 10 мкм/мл, соответственно.

Обе фракции ЛПБ₂₀ и ЛПБ₅₀ проявляют цитотоксическую активность по отношению к клеткам лейкоза. Как следует из данных таблицы 1, через 24 часа цитотоксическая активность ЛПБ₂₀ составила 61 и 46% и для фракции ЛПБ₅₀ составила 69 и 48% при дозах 100 мкм/мл и 10 мкм/мл, соответственно. Однако через 48 часов культивирования клеток с белками цитотоксичность возросла и составила для ЛПБ₂₀ 83 и 62%, а для ЛПБ₅₀ — 90 и 57% при дозах 100 и 10 мкм/мл.

Нами также было изучено действие лектиноподобных белков *Cuscuta europaea* на клетки лимфоцитов, полученных из крови здоровых доноров. Как следует из данных таблицы 1, ЛПБ также проявляют высокую цитотоксическую активность по отношению к клеткам лимфоцитов. Гибель клеток под действием фракции ЛПБ₂₀ составила 85 и 48%, а для фракции ЛПБ₅₀ составила 98 и 67% при дозах 100 мкм/мл и 10 мкм/мл, соответственно.

Таким образом, нами показано, что клетки крови чувствительны к действию лектиноподобных белков *Cuscuta europaea*, которые приводят к их гибели — как лейкозных, так и нормальных.

На протяжении многих лет химиотерапия наряду с хирургией и лучевой терапией была единственным подходом к лечению рака. Несмотря на эффективный клинический ответ химиопрепаратов, приобретенная резистентность и цитотоксичность стали основными препятствиями для успешного лечения рака. Все больше данных свидетельствует о том, что синергетическая комбинированная терапия по сравнению с монотерапией может преодолеть резистентность к терапии и позволяет снизить дозировку химиопрепаратов, что улучшает клинический исход у онкологических больных [3, 4]. Сообщалось, что комбинация химиопрепаратов с нетоксичными противоопухолевыми агентами может привести к повышению чувствительности раковых клеток к хими-

отерапии, снижению дозы химиопрепарата и, в конечном итоге, ослаблению побочных токсических эффектов.

Ранее нами было исследовано сочетанное действие лектиноподобных белков *Cuscuta europaea* с противоопухолевыми препаратами известного механизма действия и обнаружено, что действие ЛПБ₅₀ на клетки зависит от дозы белка. Результаты по совместному действию ЛПБ₅₀ с противоопухолевыми препаратами дают возможность предположить, что ЛПБ₅₀, преимущественно, действует на S-период клеточного деления [4].

В настоящей работе было изучено действие ЛПБ₅₀ *Cuscuta europaea* на перевиваемую культуру клеток В-16 (рак кожи — меланома). Для определения цитотоксического действия клетки меланомы В-16 рассеивали в 96-луночные планшеты в количестве 20–30 тыс. клеток/мл в 100 мкл среды RPMI 1640 с 10% сыворотки эмбриона теленка и культивировали при температуре 37 °С в CO₂ — инкубаторе 24 ч. и вводили белки в дозах 100, 10 и 1 мкг/мл на 100 мкл среды, как описано в работе [8].

Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

Действие лектиноподобных белков *Cuscuta europaea* на культуры клеток В-16

Дозы мкг/мл Образцы	Подавление включения МТТ в клетки, %		
	100 мкм/мл	10 мкм/мл	1 мкм/мл
Σ фракция	91,3±0,6	43,6±0,1	28,7±0,3
ЛПБ ₂₀	98,1±0,6	58,4±0,3	42,5±0,3
ЛПБ ₅₀	92,4±0,4	62,7±0,1	47,3±0,2
Цисплатин	95,3±0,1	61,3±0,4	42,7±0,4

Примечание: достоверное отличие от контроля $p < 0,05$

Как следует из данных таблицы 2, все фракции лектиноподобных белков *Cuscuta europaea* проявляли высокую дозозависимую цитотоксическую активность на клетках В-16.

Более высокую цитотоксическую активность проявляют обогащенные лектиноподобными белками фракции, осажденные 20- и 50%-ным сульфатом аммония, нежели суммарная фракция.

Приведенные в таблице 2 данные коррелируют с данными, полученными по подсчету живых клеток трипановым синим.

Полученные нами результаты дают основу для сочетанного использования конвенциональных противоопухолевых препаратов с веществами, предлагаемыми

альтернативной медициной, как в случае применения препарата «Искадор», стандартизованного по лектину LM-1.

Об эффективном использовании лектинов в виде мазей было сообщено в работе [10]. Авторами было проведено исследование по влиянию лектина *Agaricus bisporus* на рост культуры нормальных человеческих кератиноцитов и клеток, трансформированных вирусом папилломы человека. Рост культуры нормальных кератиноцитов был полностью подавлен при концентрации 3 мкг/мл лектина, выделенного из *A. bisporus*, а трансформированных — при концентрации 30 мкг/мл. Эти результаты представляют интерес для лечения ряда заболеваний, например, псориаза. Так, авторы Parslew R. et al. и др. сообщили, что на 11 пациентах с псориазом была изучена мазь, содержащая 0,1% лектина *A. bisporus*. Её применение сопровождалось выраженным клиническим эффектом [10].

Заключение

Таким образом, нами показано, что лектиноподобные белки *Cuscuta europaea* цитотоксичны как к раковым клеткам, так и здоровым.

Полученные результаты по цитотоксичности на клетках кожи (В-16) дают основу синергетического использования конвенциональных противоопухолевых препаратов с веществами, предлагаемыми альтернативной медициной, как в случае применения Искадора, стандартизованного по лектину LM-1.

В данном случае можно использовать цитотоксическое действие лектинов *Cuscuta europaea* наружно в виде гелей или мазей для лечения кожных заболеваний, включая меланому и псориаз.

Литература

1. Кахарова К.А., Хашимова Э.С., Сагдиев Н.Ж. Гликопротеиды паразитирующих растений (*Cuscuta europaea*) // Кн., посвященная памяти акад. В.П. Макеева «Фундаментальные и прикладные проблемы науки». — М., 2014. — С. 122–128.
2. Терентьева Е.О., Хамидова У.Б., Мустафина А.Т., Бобоев К.Т., Каримов Х.Я., Виноградова В.И., Азимова Ш.С. Исследование производных 1,2,3,4 — тетрагидроизохинолинов для лечения лейкозов // Ozbekiston tibbiyot Jurnalı. — 2019. — № 2. — С. 114–118.
3. Хашимова Э.С., Кахарова К.А., Терентьева Е.О., Сагдиев Н.Ж. Действие лектиноподобных белков *Cuscuta europaea* на метаболизм клетки // Вестник биотехнологии

и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2016. — Т. 12. — № 3. — С. 29–33.

4. Хашимова Э.С., Кахарова К.А., Ишимов У.Ж., Ощепкова Ю.И., Салихов Ш.И. Выделения, характеристика и биологическая активность белков *Cuscuta europaea* // «Химия природных соединений». — 2022. — № 2. — С. 273–275.
5. Arani F.Sh., Karimzadeh L., Ghafoori S.M., Nabiuni M. Antimutagenic and synergistic cytotoxic effect of cisplatin and honey bee venom on 4T1 invasive mammary carcinoma Cell Line // Advances in Pharmacological Sciences. — 2019. — Art: 7581318. doi.org/10.1155/2019/7581318.
6. Galm O., Fabry U., Efferth T., Osieka R. Synergism between Viscumin and cisplatin in not dependent on ERCC-1 expression // Cancer Let. — 2002. — Vol. 23. — P. 407–411.
7. Inaba H., Greaves M., Mullighan C.G. Acute lymphoblastic leukaemia // Lancet. — 2013. — Vol. 381. — P. 1943–1955.
8. Kakhorova K.A., Khashimova Z.S., Terenteva E.O. Studies on cytotoxicity and antioxidant activities of lectin-like proteins from phytoparasites (*Cuscuta europaea*) // Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology. — 2018. — Vol. 4(3). — P. 265–270.
9. Moran M., Tiroler A., Moyal L., et al. Synergistic cytotoxic activity of cannabinoids from cannabis sativa against cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) in vitro and ex vivo // Oncotarget. — 2020. — Vol. 11. — No. 13. — P. 1141–1156.
10. Parslew R., Jones K.T., Rhodes J.M., Sharpe G.R. The antiproliferative effect of lectin from the edible mushroom (*Agaricus bisporus*) on human keratinocytes: preliminary studies on its use in psoriasis // Br. J. Dermatol. — 1999. — Vol. 140(1). — P. 56–60.
11. Suresh V., Sruthi V., Padmaja B., Asha V.V. In vitro antiinflammatory and anticancer activities of *Cuscuta reflexa* Roxb // J. Ethanopharmacol. — 2011. — Vol. 134. — P. 872–877.
12. Zeraati F. In vitro cytotoxic effects of *Cuscuta chinensis* whole extract on human acute lymphoblastic leukemia cell line // Iran J. Med. Sci. — 2010. — Vol. 35. — P. 310–314.
13. Ziegler R. Mistletoe preparation Iscaдор: are there methodological concerns with respect to controlled clinical trials // eCAM. — 2009. — Vol. 6. — P. 19–30.

References

1. Kakharova KA, Khashimova ZS, Sagdiyev NZh. Glikoproteidy parazitiruyushchikh rasteniy (*Cuscuta europaea*). Kn., posvyashchennaya pamyati akad VP Makeyeva «Fundamental'nyye i prikladnyye problemy nauki». Moscow, 2014: 122–128 (in Russian).
2. Terent'eva YeO, Khamidova UB, Mustafina AT, Boboyev KT, Karimov KHYA, Vinogradova VI, Azimova SHS. Issledovaniye proizvodnykh 1,2,3,4 — tetragidroizokhinolinov dlya lecheniya leykozov. Ozbekiston tibbiyot Jurnalı 2019; 2:114–118 (in Russian).

3. Khashimova ZS, Kakhorova KA, Terentyeva EO, Sagdiev NZh. Deystviye lektinopodobnykh belkov *Cuscuta europaea* na metabolizm kletki. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii imeni YuA Ovchinnikova 2016; 12(3):29–33 (in Russian).
4. Khashimova ZS, Kakhorova KA, Ishimov UZh, Oshchepkova YuI, Salikhov ShI. Vydeleniya, kharakteristika i biologicheskaya aktivnost' belkov *Cuscuta europaea*. «Khimiya prirodnikh soyedineniy» 2022; 2:273–275 (in Russian).
5. Arani FSh, Karimzadeh L, Ghafoori SM, Nabiuni M. Antimutagenic and synergistic cytotoxic effect of cisplatin and honey bee venom on 4T1 invasive mammary carcinoma Cell Line. Advances in Pharmacological Sciences 2019; 7581318. doi.org/10.1155/2019/7581318.
6. Galm O, Fabry U, Efferth T, Osieka R. Synergism between Viscumin and cisplatin in not dependent on ERCC-1 expression. Cancer Let 2002; 23:407–411.
7. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 2013; 381:1943–1955.
8. Kakhorova KA, Khashimova ZS, Terentyeva EO. Studies on cytotoxicity and antioxidant activities of lectin-like proteins from phytoparasites (*Cuscuta europaea*). Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology 2018; 4(3):265–270.
9. Moran M, Tiroler A, Moyal L, et al. Synergistic cytotoxic activity of cannabinoids from cannabis sativa against cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) in vitro and ex vivo. Oncotarget 2020; 11(13):1141–1156.
10. Parslew R, Jones KT, Rhodes JM, Sharpe GR. The antiproliferative effect of lectin from the edible mushroom (*Agaricus bisporus*) on human keratinocytes: preliminary studies on its use in psoriasis. Br J Dermatol 1999; 140(1):56–60.
11. Suresh V, Sruthi V, Padmaja B, Asha VV. In vitro anti-inflammatory and anticancer activities of *Cuscuta reflexa* Roxb. J Ethanopharmacol 2011; 134:872–877.
12. Zeraati F. In vitro cytotoxic effects of *Cuscuta chinensis* whole extract on human acute lymphoblastic leukemia cell line. Iran J Med Sci 2010; 35:310–314.
13. Ziegler R. Mistletoe preparation Iscador: are there methodological concerns with respect to controlled clinical trials. eCAM 2009; 6:19–30.

CYTOTOXIC EFFECT OF *CUSCUTA EUROPAEA* LECTIN-LIKE PROTEINS ON BLOOD AND SKIN CELLS

Z.S. KHASHIMOVA, K.A. KAKHOROVA, M.K. SALAKHUTDINOVA,
M.A. KALANOVA, Yu.I. OSHCHEPKOVA, Sh.I. SALIHOV

A.S. Sadykov Institute of Bioorganic Chemistry, AS RUz, Tashkent, Republic of Uzbekistan

The paper presents data on the cytotoxic effect of *Cuscuta europaea* lectin-like proteins (LLP) growing on camel thorn (Alhagi), on B-16 cells (skin cancer) and blood cells. A pronounced cytotoxic effect of LLP on these cells and blood cells, including lymphocytes, was established.

Keywords: lectin-like proteins, B-16 cell cultures, leukemic cells, cytotoxicity, MTT.

Adress:

Khashimova Z.S., Doctor of Biological Science,
Leading researcher of the Laboratory of Proteins and Peptides
chemistry, A.S. Sadykov Institute of Bioorganic Chemistry,
AS RUz, Tashkent, Republic of Uzbekistan
E-mail: zaynat_Kh@mail.ru

Для цитирования:

Хашимова Э.С., Кахарова К.А., Салахутдинова М.К., Каланова М.А., Ощепкова Ю.И., Салихов Ш.И. Цитотоксическое действие лектиноподобных белков *Cuscuta europaea* на клетки крови и кожи. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(4):7–11.

For citation:

Khashimova Z.S., Kakhorova K.A., Salakhutdinova M.K., Kalanova M.A., Oshchepkova Yu.I., Salihov Sh.I. Cytotoxic effect of *Cuscuta europaea* lectin-like proteins on blood and skin cells. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(4):7–11 (in Russian).

ИЗУЧЕНИЕ ПРИЧИНЫ ПОВЫШЕНИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ БЕНЗИЛПЕНИЦИЛЛИНА НАТРИЕВОЙ СОЛИ ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ ИМПУЛЬСНЫМ МАГНИТНЫМ ПОЛЕМ ВЫСОКОЙ НАПРЯЖЕННОСТИ

А.В. БОГДАНОВ¹, Н.А. РОДЕНКО^{2,3*}, В.А. ГЛУЩЕНКОВ^{2,3}, В.А. ЖУКОВА², Т.И. ВАСИЛЬЕВА³

¹Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова. Обособленное структурное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр» Казанский научный центр РАН», Казань;

²ФГБУН Самарский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Самара;

³ФГАОУ ВО Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева, Самара

В статье описан факт повышения антибактериальной активности бензилпенициллина натриевой соли после ее обработки импульсным магнитным полем (ИМП). Обработку порошкообразного антибиотика проводили на магнитно-импульсной установке (МИУ) с интенсивностью магнитного поля $H=(0,09-1,02)\cdot 10^6$ А/м. Форма импульса — затухающая синусоида с частотной характеристикой $f_1=40$ кГц, $f_2=51$ кГц. Цель данной работы понять причины повышения биологической активности бензилпенициллина, изучить те изменения, которые происходят в молекуле под воздействием ИМП. В исследованиях использовались экспериментальные методы ЯМР- и ИК-Фурье спектроскопии. Установлено изменение величин химических сдвигов (δ_H) и констант спин-спинового взаимодействия ($^2J_{HH}$) сигналов метиленовых протонов бензильного заместителя в результате воздействия ИМП. С помощью ИК-Фурье спектроскопии выявлены изменения в полосах поглощения связей N-H и C=O амидной группировки и карбонильной группы лактамного цикла. Полученные спектральные данные позволяют сделать вывод о конфигурационном изменении молекулы бензилпенициллина натриевой соли в амидном фрагменте под влиянием ИМП, что, возможно, и является причиной повышения антибактериальной активности антибиотика.

Ключевые слова: импульсное магнитное поле, цилиндрический индуктор, бензилпенициллина натриевая соль, антибактериальная активность, конфигурационное изменение.

Введение

Возникновение резистентности бактериальных патогенов к используемым антибиотикам в настоящее время является одной из значительных угроз здоровью человечества [11, 17, 18, 23]. Имеется несколько направлений решения этой проблемы, два из которых относятся к созданию новых антибиотиков или повышению антибактериальной активности существующих препаратов. Первое направление является дорогостоящим и реализуется в течение длительного временного периода. Возможен другой путь решения проблемы — воздействие

физическими факторами на лекарственный препарат для повышения его биологической активности, например, магнитными полями.

Большинство найденных в этом направлении работ [4, 6, 9, 10, 14, 20] описывает повышение биологической активности лекарственных препаратов при воздействии магнитными полями на различные культуры микроорганизмов. Согласно имеющимся литературным данным, магнитные поля способны модифицировать фармакологические свойства лекарственных веществ. В частности, они потенцируют действие противовоспалительных препаратов, гипотензивных, нейротропных, некоторых химиотерапевтических противоопухолевых средств, снижают активность холинергических лекарственных веществ. Основанием для использования в этих целях магнитных полей послужили сведения о том, что этот физический фактор (магнитное поле) ускоряет диффузионные процессы, повышает сосудистую и эпителиальную проницаемость, улучшает биодоступность лекарственных веществ. Однако

© 2023 г. Богданов А.В., Роденко Н.А., Глушечков В.А., Жукова В.А., Васильева Т.И.

* Автор для переписки:

Роденко Наталья Алексеевна

младший научный сотрудник лаборатории «Биоинженерия» Самарского федерального исследовательского центра Российской академии наук

E-mail: t.rodenco@mail.ru

теоретические основы метода требуют дальнейшего изучения. Несмотря на недостаточную разработку научных основ, данный метод активно используется в комплексном лечении ряда заболеваний [5].

Работы [15, 16] зарубежных ученых показывают, что магнитное поле способно изменять биологическую активность различных лекарственных препаратов (митоксантрон, даунорубин, актиномицин D, блеомицин и зиностатин, цисплатин, митомицин С и доксорубин). Например, согласно работе [13] на активность противоопухолевого препарата цисплатина оказывает влияние статическое магнитное поле при индукциях магнитного поля $B=10$ мТл, $B=15$ мТл и $B=25$ мТл. Усиливается терапевтический эффект цисплатина и снижается резистентность клеток A2780-CP (культура клеток рака яичников). Имеются данные, свидетельствующие о том, что электромагнитное поле крайне высокой частоты $f=53$ ГГц увеличивает антибактериальные свойства антибиотиков (тетрациклин, канамицин, хлорамфеникол, цефтриаксон) в отношении бактерий *Escherichia coli* [22].

Активизация уже введенных в организм пациента лекарственных препаратов, как правило, осуществляется под воздействием постоянных полей [1]. Работ, посвященных увеличению биологической активности готовых препаратов под влиянием импульсных магнитных полей непосредственно перед инъекцией не обнаружено.

Как показали проведенные ранее исследования, обработка бензилпенициллина натриевой соли ИМП приводит к увеличению ее антибактериальной активности до 24% в отношении бактерий *Escherichia coli* M 17 (*E. coli* M 17) и *Micrococcus luteus* [3, 7].

Целью данной работы является определение причины изменения биологической активности бензилпенициллина натриевой соли после ее обработки импульсным магнитным полем высокой напряженности.

Материалы и методы

В качестве методов исследования причины изменения биологической активности бензилпенициллина натриевой соли применялись ЯМР-спектроскопия и ИК-Фурье-спектроскопия. Объектом исследования являлись образцы порошкообразного препарата бензилпенициллина натриевой соли двух производителей ПАО Синтез (Россия), Sigma-Aldrich (США).

На рисунке 1 представлена схема воздействия ИМП на бета-лактамы антибиотик: магнитное поле свободно проходит через стенку стеклянного флакона и воздействует на лекарственный препарат [2].

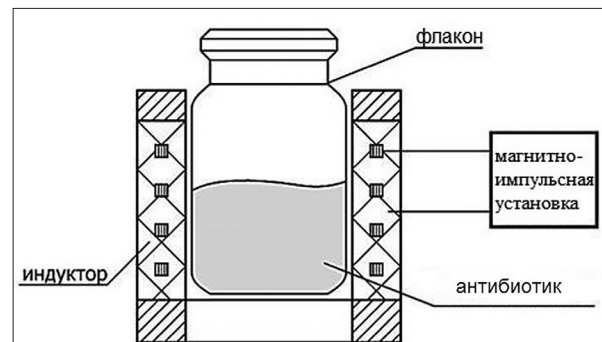


Рис. 1. Схема воздействия ИМП на бензилпенициллина натриевую соль

Был создан экспериментальный стенд для обработки антибиотика ИМП и замера параметров магнитного воздействия, включающий в себя магнитно-импульсную установку, индуктор, датчики замера тока, напряженности магнитного поля и осциллограф для фиксации параметров.

На рисунке 2 представлен вид кривой разрядного тока синусоидальной формы, где I_{1max} — амплитуда 1-го полупериода тока, I_{3max} — амплитуда 3-го полупериода тока, T — период колебаний.

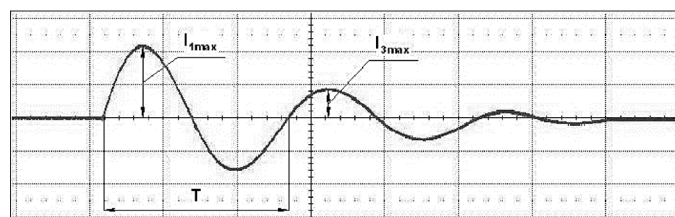


Рис. 2. Вид кривой разрядного тока в индукторе, представляющий собой затухающую синусоиду

В экспериментах проводили обработку ИМП порошкообразного препарата бензилпенициллина натриевой соли при напряженностях магнитного поля от $H=0,09 \cdot 10^6$ А/м до $H=0,82 \cdot 10^6$ А/м, при частоте $f=40$ кГц и $f=51$ кГц с числом импульсов $n=1$. В качестве контроля служили флаконы с необработанным бета-лактамы антибиотиком. Время действия ИМП на лекарственный препарат $\tau=(50 \div 100) \cdot 10^{-6}$ сек.

ЯМР-спектроскопия. Исследование строения молекулы бензилпенициллина натриевой соли выполнялось на ЯМР-спектрометре «Bruker Avance 400» (Германия). После обработки порошкообразного антибиотика в магнитном поле осуществлялась регистрация спектров ЯМР 1H для раствора антибиотика в дейтерированной воде (D_2O) с концентрацией $C=0,033$ г/мл с рабочей частотой прибора 400 МГц. Для сравнения в идентич-

ных условиях были записаны спектры необработанного препарата.

ИК-Фурье спектроскопия. В рамках работы были зарегистрированы ИК-спектры препарата до и после обработки ИМП. Спектры записаны в таблетке КВг в отношении 1:100 на приборе «ФСМ-2201» (Россия) в интервале 470–5000 см⁻¹. Обработку полученных спектральных данных проводили с использованием программы «Fspes» (Россия). Исследуемая смесь помещалась в кювету в специальном держателе, после чего регистрировались спектры диффузного отражения [8].

Результаты

По данным ЯМР ¹H-спектроскопии, был сделан вывод о сохранении каркаса бензилпенициллина натриевой соли и всех связей экзоциклических фраг-

ментов. При этом были выявлены изменения величин химических сдвигов сигналов метиленовых протонов (CH₂) и константы их спин-спинового взаимодействия (²J_{HH}). Так, в спектре ЯМР ¹H необработанной ИМП субстанции бета-лактамного антибиотика присутствует сигнал метиленовых протонов в виде мультиплета в области 3,60–3,70 м.д. с одинаковыми константами спин-спинового взаимодействия (КССВ) ²J_{HH}=15,08 Гц (рис. 3). Обработка магнитным полем с напряженностью H=0,64 10⁶ А/м привела к изменению одной из КССВ (²J_{HH}=15,08 Гц и ²J_{HH}=15,04 Гц), как следует из данных спектра ЯМР ¹H (рис. 4).

Наблюдаемые изменения в спектрах ЯМР ¹H после обработки ИМП указывают на изменение взаимного расположения метиленовых протонов и, вероятно, слабого конфигурационного изменения бензильного заместителя в целом.

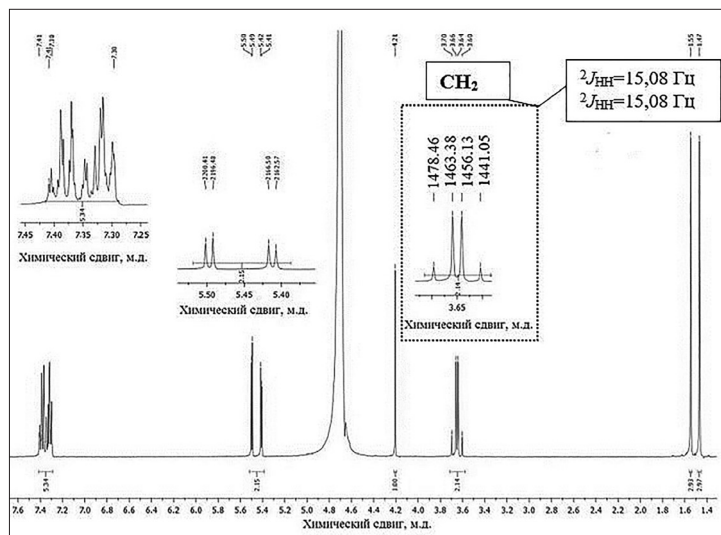


Рис. 3. Спектр ЯМР ¹H бензилпенициллина натриевой соли до воздействия ИМП

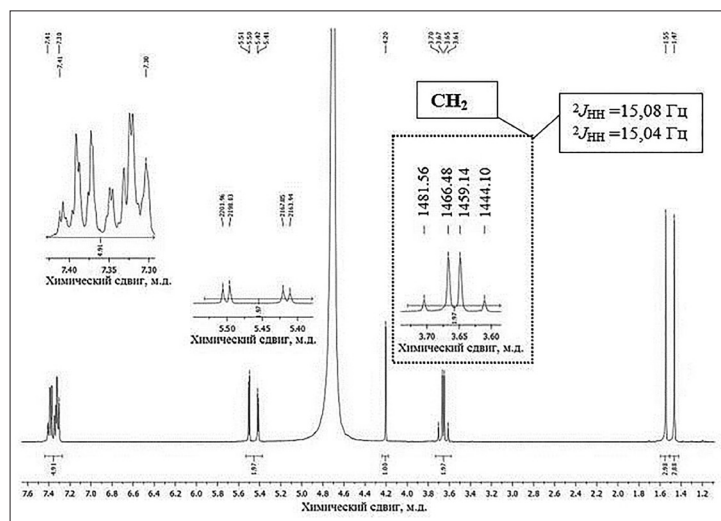


Рис. 4. Спектр ЯМР ¹H бензилпенициллина натриевой соли, обработанной при H=0,64·10⁶ А/м

Методом ИК-спектроскопии зафиксировано, что увеличение интенсивности магнитного поля при воздействии с напряженностями в диапазоне $H=(0,09 \div 0,82) \cdot 10^6 \text{ А/м}$ на бензилпенициллина натриевую соль приводит к уменьшению интенсивности полосы поглощения при 3320 см^{-1} и разрешению полос при 3355 см^{-1} и 3369 см^{-1} , которые относятся к валентным колебаниям связи N-H (рис. 5, табл. 1).

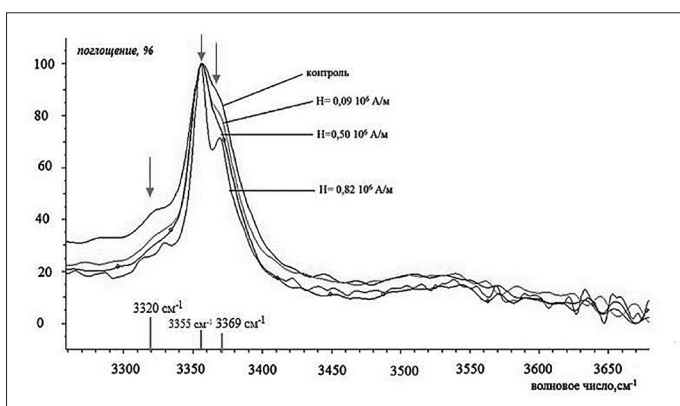


Рис. 5. Фрагменты ИК-спектров бензилпенициллина натриевой соли до и после обработки ИМП

Обработка ИМП молекулы бензилпенициллина натриевой соли привела к небольшим изменениям интенсивностей поглощения валентных колебаний связи C=O лактамного цикла (полоса 1672 см^{-1}) и связи C=O амидной группы (полоса 1699 см^{-1}); при этом изменений в колебаниях связи C=O карбоксильной группы (полоса 1773 см^{-1}) не выявлено (рис. 6, табл. 1).

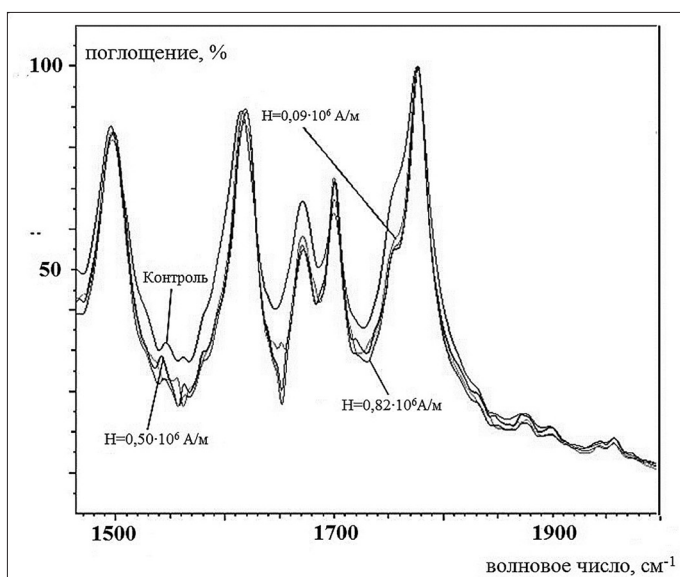


Рис. 6. Фрагменты ИК-спектров бензилпенициллина натриевой соли до и после обработки ИМП

Таблица 1

Изменение интенсивности некоторых полос поглощения в ИК-спектрах после воздействия ИМП на бензилпенициллина натриевую соль

Полоса, см^{-1}	Контроль	Обработка при напряженности $H=0,09 \cdot 10^6$	Обработка при напряженности $H=0,50 \cdot 10^6$	Обработка при напряженности $H=0,82 \cdot 10^6$
		А/м	А/м	А/м
1672	32,7	40,0	37,0	37,4
1699	63,7	71,7	71,2	66,3
1773	98,5	98,5	99,8	99,8
3320	42,6	33,5	29,6	27,0
3355	100,0	96,7	96,7	100,0
3369	85,6	80,6	73,8	70,4

Обработка ИМП молекулы бензилпенициллина натриевой соли вызывает изменения в полосах поглощения связей N-H и C=O амидной группировки и карбонильной группы лактамного цикла. Зафиксированные изменения в функциональных группировках антибиотика, возможно, происходят из-за того, что под действием ИМП незначительно изменяется геометрия молекулы, а, следовательно, изменяется величина дипольного момента.

Обсуждение

Бета-лактамы обладают бактерицидным действием за счет ингибирования синтеза пептидогликанового слоя клеточных стенок бактерий. Клеточная стенка бактерий состоит из пептидогликана (мууреина), который представляет собой линейные полисахаридные цепочки, построенные из остатков моносахаридов N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, сшитые через остатки N-ацетилмурамовой кислоты короткими пептидными «мостиками». Каждый такой «мостик» состоит из пяти аминокислот, из которых две концевые D-аланил-D-аланин. Структурное сходство между бета-лактамами антибиотиками и D-аланил-D-аланином облегчает их связывание с активным сайтом пенициллин-связывающих белков, которые известны как DD-транспептидазы (рис. 7) [21, 24].

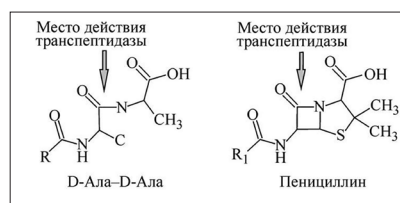


Рис. 7. Сравнение молекулярной структуры пенициллина и D-аланил-D-аланина

Бета-лактамно ядро молекулы антибиотика необратимо связывается (ацилирует) с остатком Ser активного сайта транспептидазы. Это необратимое ингибирование фермента предотвращает окончательное сшивание (транспептидирование) зарождающегося пептидогликанового слоя, нарушая синтез клеточной стенки, что в результате приводит к разрушению бактериальной клетки [19].

Например, известно, что бета-лактамный антибиотик может ацилировать белок РВР5fm по механизму, в котором образование ковалентной связи между пенициллином и серином активного сайта Ser₄₂₂ сопровождается переносом протона Ser₄₂₂ непосредственно на Ser₄₈₀ и переносом гидроксильного водорода Ser₄₈₀ на бета-лактамный азот [12].

Изменение строения функциональных группировок, присоединенных к амидному атому азота бета-лактамного антибиотика, влияет на его связывающую

способность с ферментом. Соответственно, изменить уровень биологической активности препарата, преодолев возникшую к нему устойчивость, можно путем изменения структуры этих заместителей [24].

По данным ЯМР ¹H-спектроскопии и ИК-Фурье спектроскопии, выявлены небольшие изменения геометрии молекулы бензилпенициллина натриевой соли после воздействия ИМП высокой напряженности. Этот конфигурационный переход, вероятнее всего, сказывается на изменении величины дипольного момента молекулы и доступности амидной группировки при взаимодействии с пенициллин-связывающими белками бактериальной клетки, что, следовательно, влияет на повышение антибактериальной активности препарата. Имеющиеся данные литературы и полученные в работе результаты позволяют предположить схему ингибирования фермента транспептидазы с модифицированной в ИМП молекулой бензилпенициллина натриевой соли (рис. 8).

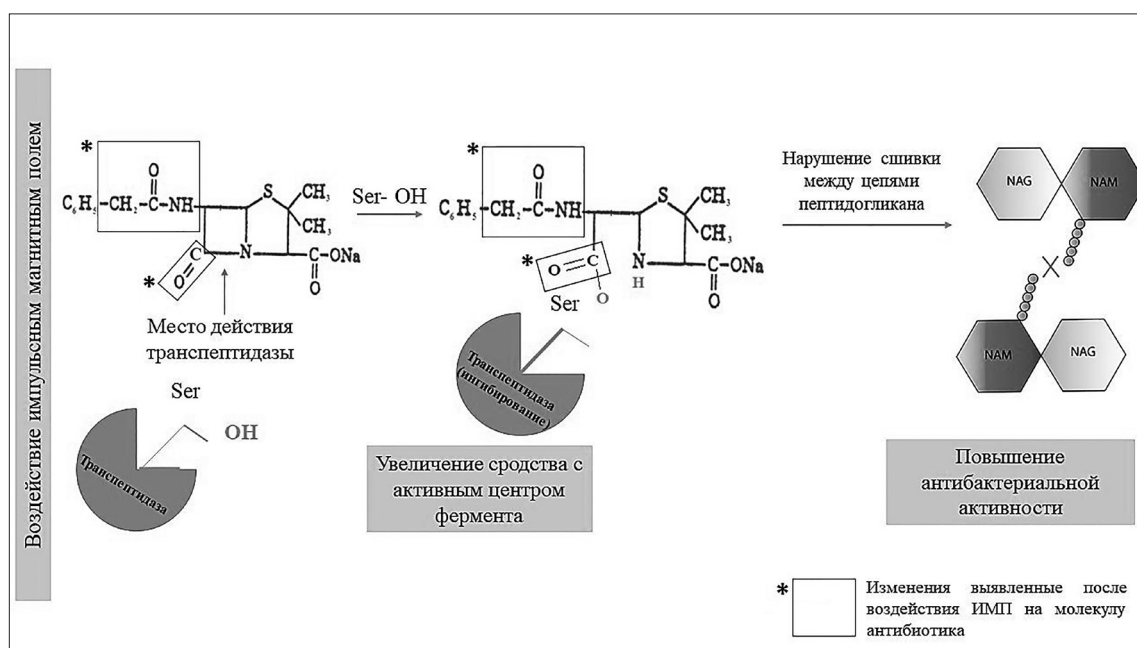


Рис. 8. Предполагаемая схема увеличения антибактериальной активности бензилпенициллина натриевой соли после воздействия ИМП

Известно, что параметры химических связей (длина, энергия, взаимное расположение) в молекуле в той или иной степени являются лабильными. При наложении физической силы к молекуле (например, при воздействии электромагнитным полем) возможно изменение ее конфигурации, которое будет приводить к переходу молекулы в другую энергетическую форму. Такие изменения в конфигурации молекулы лекарственного препарата (они представлены на схеме сиреневым цветом) после обработки электромагнитным полем будут изменять

дипольный момент молекулы, что будет способствовать увеличению сродства с активным сериновым центром транспептидазы, и присоединение бета-лактамного антибиотика к активному центру фермента будет происходить легче. Будучи в возбужденном состоянии, молекула будет быстрее ингибировать фермент транспептидазу через сериновую группировку -ОН и способствовать раскрытию бета-лактамного кольца антибиотика. При этом протон перейдет к атому азота (как показано на схеме), а фермент свяжется через связь С-О при четы-

рехленном цикле. Таким образом, быстрое связывание бета-лактаминового антибиотика с активным сериновым центром транспептидазы будет вызывать нарушение последней стадии биосинтеза клеточной стенки бактерий — поперечную сшивку между цепями пептидогликана, что будет проявляться в повышении антибактериального эффекта.

Полученные данные о влиянии ИМП на бета-лактаминный антибиотик дают возможность расширить современные представления о влиянии ИМП на конфигурацию молекулы и свойства веществ. Таким образом, конечный эффект воздействия ИМП на биологическую активность антибиотика зависит от физических параметров обработки лекарственного вещества. Представленные в настоящей работе данные могут послужить научной основой для разработки концепции увеличения биологической активности лекарственных препаратов после их обработки ИМП.

Заключение

На основании проделанной работы можно сделать следующие выводы:

1. С помощью ЯМР ^1H выявлены небольшие изменения в химических сдвигах сигналов и константах спин-спинового взаимодействия метиленовых протонов в спектре бензилпенициллина натриевой соли после обработки ИМП.

2. Методом ИК-Фурье спектроскопии установлены изменения в молекуле бензилпенициллина натриевой соли после обработки ИМП в полосах поглощения связей N-H и C=O амидной группировки и карбонильной группы лактамного цикла.

3. Предложена предполагаемая схема повышения биологической активности бензилпенициллина натриевой соли после воздействия ИМП: небольшие изменения конфигурации амидного заместителя приводят к повышению сродства к активному центру транспептидазы, что увеличивает антибактериальную активность антибиотика.

Литература

1. Алексеева Н.В., Основина И.П., Владимирцева Е.Л., Иванов А.В. Обоснование возможности применения магнитофореза при патологии суставов // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. — 2018. — Т. 95. — № 3. — Р. 49–56.
2. Глущенков В.А., Юсупов Р.Ю. Энергетические установки для магнитно-импульсной обработки материалов. — Самара: издательский дом Фёдоров, 2013. — 123 с.

3. Глущенков В.А. и др. Изменение антибактериальной активности бензилпенициллина натриевой соли под воздействием импульсного магнитного поля высокой напряженности // Биофизика. — 2019. — Т. 64. — № 2. — С. 296–306.
4. Гребенников А.М. Повышение эффективности терапии лекарственных средств методами и средствами магнитобиологии на основе оптимизации характеристик магнитного поля: специальность 05.13.01 «Системный анализ, управление и обработка информации»: автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. — Москва, 2001. — 19 с.
5. Золотухина Е.И. Основы импульсной магнитотерапии. — Витебск: Витебская областная типография, 2008. — 144 с.
6. Лобанов А.Ю. Вращающиеся импульсное магнитное поле в комплексе лечения хронической обструктивной болезни легких: специальность 14.00.51 «Восстановительная медицина, лечебная физкультура и спортивная медицина, курортология и физиотерапия»: автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. мед. наук. — Москва, 2005. — 24 с.
7. Роденко Н.А. и др. Исследование антимицробной активности бета-лактаминных антибиотиков после воздействия на них импульсным магнитным полем // Сборник II Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы и перспективы фармацевтической науки и практики». — 2022. — С. 341–345.
8. Тыжигирова В.В. Применение ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной спектроскопии в анализе лекарственных средств: учебное пособие. — Иркутск: ИГМУ, 2018. — 72 с.
9. Шапоров В. Влияние магнитного поля на действие лекарственных веществ. Доступно по: URL: https://www.medchitalka.ru/medicina_segodnya/medicinskaya_orbita/3398.html (дата обращения 13.06.2023).
10. Al-Delaimi M.S., Yacoob Aldosky H.Y. Amending the efficiency of antimicrobials against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* by low-frequency magnetic fields // Bull. Exp. Biol. Med. — 2020. — Vol. 170(1). — P. 35–39.
11. Aslam B. et al. Antibiotic resistance: A rundown of a global crisis. Infection and drug resistance // Infection and Drug Resistance. — 2018. — Vol. 11. — P. 1645–1658.
12. Dive G., Dehareng D. Serine peptidase catalytic machinery: cooperative one-step mechanism // International Journal of Quantum Chemistry. — 1999. — Vol. 73(2). — P. 161–174.
13. Jalali A. et al. Combination of static magnetic field and cisplatin in order to reduce drug resistance in cancer cell lines // International Journal of Radiation Biology. — 2019. — Vol. 95. — No. 8. — P. 1194–1201.
14. Juncker R.B., Lazazzera B.A., Billi F. Pulsed electromagnetic fields disrupt *Staphylococcus epidermidis* // Microbiol.

- Spectr. — 2022. — Vol. 10. — No. 6. — e0194922. doi: 10.1128/spectrum.01949-22.
15. Kakikawa M., Imai S., Yamada S. Effect of Extremely Low-Frequency (ELF) magnetic fields on the potency of drugs in bacterial cells // IEEE Transactions on Magnetics. — 2014. — Vol. 50. — No. 4. — P. 1–4. doi: 10.1109/TMAG.2013.2286781.
 16. Kakikawa M., Maeda T., Yamada S. Combined Effect of 60 Hz Magnetic Fields and Anticancer Drugs on Human Hepatoma HepG2 Cells // IEEE Journal of Electromagnetics, RF and Microwaves in Medicine and Biology. — 2019. — Vol. 3. — No. 1. — P. 56–60.
 17. Noor R. et al. Effectiveness of antibiotics: Anti-bacterial activity or microbial drug resistance // Bangladesh Journal of Microbiology. — 2020. — Vol. 36. — No. 2. — P. 111–114.
 18. Nwobodo D.C. et al. Antibiotic resistance: The challenges and some emerging strategies for tackling a global menace // Journal of Clinical Laboratory Analysis. — 2022. — Vol. 36. — No. 9. — e24655. doi: 10.1002/jcla.24655.
 19. Sauvage E. et al. The 2.4-Å crystal structure of the penicillin-resistant penicillin-binding protein PBP5_{fm} from *Enterococcus faecium* in complex with benzylpenicillin // Cellular and Molecular Life Sciences. — 2022. — Vol. 59. — No. 7. — P. 1223–1232.
 20. Sumardi et al. The effect of magnetic field on antibiotic inhibition for *Escherichia coli* and *Bacillus* sp. // Jurnal Kedokteran Hewan. — 2019. — Vol. 13. — No. 1. — P. 5–9.
 21. Tipper D.J., Strominger J.L. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to all-D-alanyl-D-alanine // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 1965. — Vol. 54. — No. 4. — P. 1133–1141.
 22. Torgomyan H., Trchounian A. The enhanced effects of antibiotics irradiated of extremely high frequency electromagnetic field on *Escherichia coli* growth properties // Cell Biochem Biophys. — 2015. — Vol. 71. — No. 1. — P. 419–424.
 23. Urban-Chmiel R. et al. Antibiotic resistance in Bacteria — A review // Antibiotics (Basel). — 2022. — Vol. 11. — No. 8. — Art. 1079. doi: 10.3390/antibiotics11081079.
 24. Waxman D.J., Strominger J.H. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics // Annual Review of Biochemistry. — 1983. — No. 52. — P. 825–869.
 2. Glushchenkov VA, Yusupov RYu. Energeticheskiye ustanovki dlya magnitno-impul'snoy obrabotki materialov. Samara: izdatel'skiy dom Fodorov, 2013: 123 (in Russian).
 3. Glushchenkov VA i dr. Izmeneniye antibakterial'noy aktivnosti benzilpenitsillina natriyevoy soli pod vozdeystviyem impul'snogo magnitnogo polya vysokoy napryazhennosti. Biofizika 2019; 64(2):296–306 (in Russian).
 4. Grebennikov AM. Povysheniye effektivnosti terapii lekarstvennykh sredstv metodami i sredstvami magnitobiologii na osnove optimizatsii kharakteristik magnitnogo polya: spetsial'nost' 05.13.01 «Sistemnyy analiz, upravleniye i obrabotka informat-sii»: avtoref dis na soiskaniye uch st kand biol nauk. Moscow, 2001: 19 (in Russian).
 5. Zolotukhina YeI. Osnovy impul'snoy magnitoterapii. Vitebsk: Vitebskaya oblastnaya tipografiya, 2008: 144 (in Russian).
 6. Lobanov AYu. Vrashchayushchiesya impul'snoye magnitnoye pole v komplekse lecheniya khronicheskoy obstruktivnoy bolezni legkikh: spetsial'nost' 14.00.51 «Vosstanovitel'naya meditsina, lechebnaya fizkul'tura i sportivnaya meditsina, kurortologiya i fizioterapiya»: avtoref dis na soiskaniye uch st kand med nauk. Moscow, 2005: 24 (in Russian).
 7. Rodenko NA i dr. Issledovaniye antimikrobnoy aktivnosti beta-laktamnykh antibiotikov posle vozdeystviya na nikh impul'snym magnitnym polem. Sbornik II Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Aktual'nyye problemy i perspektivy farmatsevticheskoy nauki i praktiki» 2022: 341–345 (in Russian).
 8. Tyzhigirova VV. Primeneniye ul'trafiol'tovoy, vidimoy i infrakrasnoy spektroskopii v analize lekarstvennykh sredstv: uchebnoye posobiye. Irkutsk: IGMU, 2018: 72 (in Russian).
 9. Shaporov V. Vliyaniye magnitnogo polya na deystviye lekarstvennykh veshchestv. URL: https://www.medchitalka.ru/medicina_segodnya/medicinskaya_orbita/3398.html (data of access 13.06.2023).
 10. Al-Delaimi MS, Yacoob Aldosky HY. Amending the efficiency of antimicrobials against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* by low-frequency magnetic fields. Bull Exp Biol Med 2020; 170(1):35–39.
 11. Aslam B et al. Antibiotic resistance: A rundown of a global crisis. Infection and drug resistance. Infection and Drug Resistance 2018; 11:1645–1658.
 12. Dive G, Dehareng D. Serine peptidase catalytic machinery: cooperative one-step mechanism. International Journal of Quantum Chemistry 1999; 73(2):161–174.
 13. Jalali A. et al. Combination of static magnetic field and cisplatin in order to reduce drug resistance in cancer cell lines. International Journal of Radiation Biology 2019; 95(8):1194–1201.
 14. Juncker R.B., Lazazzera B.A., Billi F. Pulsed electromagnetic fields disrupt *Staphylococcus epidermidis*. Mi-

References

1. Alekseyeva NV, Osnovina IP, Vladimirtseva YeL, Ivanov AV. Obosnovaniye vozmozhnosti primeneniya magnitoforeza pri patologii sustavov. Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoy fizicheskoy kul'tury 2018; 95(3):49–56 (in Russian).

- crobiol. Spectr 2022; 10(6):e0194922. doi: 10.1128/spectrum.01949-22.
15. Kakikawa M, Imai S, Yamada S. Effect of Extremely Low-Frequency (ELF) magnetic fields on the potency of drugs in bacterial cells. *IEEE Transactions on Magnetics* 2014; 50(4):1–4. doi: 10.1109/TMAG.2013.2286781.
 16. Kakikawa M, Maeda T, Yamada S. Combined Effect of 60 Hz Magnetic Fields and Anticancer Drugs on Human Hepatoma HepG2 Cells. *IEEE Journal of Electromagnetics, RF and Microwaves in Medicine and Biology* 2019; 3(1):56–60.
 17. Noor R et al. Effectiveness of antibiotics: Anti-bacterial activity or microbial drug resistance. *Bangladesh Journal of Microbiology* 2020; 36(2):111–114.
 18. Nwobodo DC et al. Antibiotic resistance: The challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2022; 36(9). — e24655. doi: 10.1002/jcla.24655.
 19. Sauvage E et al. The 2.4-Å crystal structure of the penicillin-resistant penicillin-binding protein PBP5fm from *Enterococcus faecium* in complex with benzylpenicillin. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2022; 59(7):1223–1232.
 20. Sumardi et al. The effect of magnetic field on antibiotic inhibition for *Escherichia coli* and *Bacillus* sp. *Jurnal Kedokteran Hewan* 2019; 13(1):5–9.
 21. Tipper DJ, Strominger JL. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to all-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1965; 54(4):1133–1141.
 22. Torgomyan H., Trchounian A. The enhanced effects of antibiotics irradiated of extremely high frequency electromagnetic field on *Escherichia coli* growth properties. *Cell Biochem Biophys* 2015; 71(1):419–424.
 23. Urban-Chmiel R. et al. Antibiotic resistance in Bacteria — A review. *Antibiotics (Basel)* 2022; 11(8):1079. doi: 10.3390/antibiotics11081079.
 24. Waxman DJ, Strominger JH. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annual Review of Biochemistry* 1983; 52:825–869.

STUDY OF REASONS OF THE INCREASE IN THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF BENZYL PENICILLIN SODIUM SALT AFTER PROCESSING IT WITH A HIGH-INTENSITY PULSED MAGNETIC FIELD

A.V. BOGDANOV¹, N.A. RODENKO^{2,3}, V.A. GLUSHCHENKOV^{2,3},
V.A. ZHUKOVA², T.I. VASILYEVA³

¹*Institute of Organic and Physical Chemistry named by A.E. Arbuzov, Kazan;*

²*Samara Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Samara;*

³*Samara National Research University named by academician S.P. Korolyev, Samara*

The article describes the fact of increase in antibacterial activity of benzylpenicillin sodium salt after processing it with a pulsed magnetic field (PMF). Processing of the powdered antibiotic was carried out on the pulse-magnetic installation with a magnetic field intensity of $H=(0,09–1,02) \cdot 10^6$ A/m. The shape of the pulse is a damped sinusoid with a frequency $f=40$ kHz. The purpose of this work is to understand the reasons of increased biological activity of benzylpenicillin, to study the changes that occur in the molecule under the action of the PMF. Experimental methods of NMR-spectroscopy and IR-Fourier-spectroscopy were used in the research. The changes in the values of chemical shifts (δ_H) and constants of the spin-spin interaction ($^2J_{HH}$) of the signals of methylene protons of the benzyl substituent as a result of the PMF action has been established. IR-Fourier spectroscopy revealed changes in the absorption bands of the bonds of the N-H and C=O amide group and the carbonyl group of the lactam cycle. The obtained spectral data made it possible to conclude about the configuration change of benzylpenicillin sodium salt molecule in the amide fragment under the PMF influence, which may be the reason for the increased antibacterial activity of the antibiotic.

Keywords: pulsed magnetic field, cylindrical inductor, benzylpenicillin sodium salt, antibacterial activity, configuration change.

Address:

Rodenko N.A.

Junior Researcher, Laboratory of Bioengineering Samara

Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences

E-mail: t.rodenko@mail.ru

Для цитирования:

Богданов А.В., Роденко Н.А., Глушченков В.А., Жукова В.А., Васильева Т.И. Изучение причины повышения антибактериальной активности бензилпенициллина натриевой соли после обработки импульсным магнитным полем высокой напряженности. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(4):12–20.

For citation:

Bogdanov A.V., Rodenko N.A., Glushchenkov V.A., Zhukova V.A., Vasilyeva T.I. Study of reasons of the increase in the antibacterial activity of benzylpenicillin sodium salt after processing it with a high-intensity pulsed magnetic field. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(4):12–20 (in Russian).

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ШТАММОВ *FRANCISELLA TULARENSIS* ПОДВИДА *MEDIASIATICA*

В.М. СОРОКИН^{1*}, Н.В. ПАВЛОВИЧ¹, М.В. ЦИМБАЛИСТОВА¹, А.С. ВОДОПЬЯНОВ¹,
Р.В. ПИСАНОВ¹, Г.Х. БАЗАРОВА², Е.Н. РОЖДЕСТВЕНСКИЙ², А.К. НОСКОВ¹

¹ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону;

²ФКУЗ Алтайская ПЧС Роспотребнадзора, Горно-Алтайск

Туляремия относится к природно-очаговым инфекциям, эндемичные очаги которой широко распространены в северном полушарии земного шара, включая Россию. В настоящее время *F. tularensis* делится на четыре подвида: *F. tularensis* subsp. *tularensis*, *F. tularensis* subsp. *holarctica*, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, *F. tularensis* subsp. *novicida*, которые различаются по своей патогенности и географическому распределению. Подвид *mediasiatica* наименее изучен в силу доступности для исследования лишь единичных штаммов этого подвида. В последние годы ситуация изменилась в связи с выделением штаммов среднеазиатского подвида на территории Алтайского края Российской Федерации. Цель исследования заключалась в сравнительном изучении филогенетических характеристик штаммов *F. tularensis*, выделенных в разное время в Алтайском крае и штаммов из Средней Азии из коллекции нашего института. Для генотипирования возбудителя туляремии были использованы методы VNTR и INDEL-типирования. Проведено сравнительное изучение выборки штаммов *F. tularensis* подвида *mediasiatica*, выделенных в разное время в Алтайском крае и штаммов из Средней Азии из коллекции нашего института, совместно с группой из 13 штаммов подвида *tularensis*. Комплексный подход позволил разделить все изученные штаммы на пять кластеров с дифференциацией двух подгрупп (А.I и А.II) в подвиде *tularensis* и трех подгрупп у подвида *mediasiatica*. Показана высокая степень генетического разнообразия штаммов подвида *mediasiatica*, что ранее было затруднительно из-за небольшого количества доступных штаммов *F. tularensis* подвида *mediasiatica*.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, subsp. *mediasiatica*, INDEL-типирование, VNTR-типирование, филогенетика.

Введение

Туляремия относится к природно-очаговым инфекциям, эндемичные очаги которой широко распространены в северном полушарии земного шара, включая Россию. В настоящее время *F. tularensis* делится на четыре подвида: *F. tularensis* subsp. *tularensis*, *F. tularensis* subsp. *holarctica*, *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, *F. tularensis* subsp. *novicida*, которые различаются по своей патогенности и географическому распределению [14]. Исторически такое разделение было обусловлено различным ареалом циркуляции штаммов, их отличиями в биохимической активности и патогенностью для разных хозяев [2, 3].

F. tularensis subsp. *tularensis* высоко вирулентна для кроликов; *F. tularensis* subsp. *holarctica* менее вирулентна, а *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* с ограниченным распространением в Центральной Азии (Казахстан и Туркменистан) [13, 16] по вирулентности для кроликов сходна с возбудителем туляремии subsp. *holarctica* [14]. Подвид *mediasiatica* наименее изучен в силу доступности для исследования лишь единичных штаммов этого подвида. В последние годы ситуация изменилась в связи с выделением штаммов среднеазиатского подвида на территории Алтайского края Российской Федерации в 2011 г. [1]. Было показано, что три изолята подвида *mediasiatica* отличаются от ранее выделенных на территории Средней Азии штаммов. В 2013–2014 гг. в Алтайском крае было выделено еще 15 штаммов подвида *mediasiatica*. Проведено сравнительное исследование MLVA генотипов и биохимических свойств штаммов, выделенных как в Алтайском крае, так и ранее в Средней Азии. На основании полученных результатов предложено разделение штаммов подвида *mediasiatica* на три филогенетических группы, М.I, М.II и М.III

© 2023 г. Сорокин В.М., Павлович Н.В., Цимбалистова М.В., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Базарова Г.Х., Рождественский Е.Н., Носков А.К.

* Автор для переписки:

Сорокин Владимир Михайлович

к.б.н., с.н.с., ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону,

E-mail: soroکا53@mail.ru

[18]. В 2021 г. штамм подвида *mediasiatica* был выделен в Красноярском крае на расстоянии более 500 км от Алтайского природного очага [19].

В 2022 г. коллекция нашего института была пополнена 8 штаммами *F. tularensis*, выделенными в Алтайском крае в 2022 г. и любезно предоставленными сотрудниками Алтайской ПЧС.

Цель исследования заключалась в сравнительном изучении филогенетических характеристик штаммов *F. tularensis*, выделенных в разное время в Алтайском крае и штаммов из Средней Азии из коллекции нашего института.

Материалы и методы

В работе были использованы 16 штаммов *F. tularensis* подвида *mediasiatica*, изолированных из различных источников в период с 1960 по 2022 гг. и 12 штаммов подвида *tularensis*. Бактерии выращивали на среде Т в течение 24 часов при 37 °С [8]. Культурально-морфологические, биохимические и биологические свойства туляремийного микроба изучали в соответствии с МУ 3.1.2007-05 «Эпидемиологический надзор за туляремией» [12]. Антибиотикочувствительность исследуемых культур изучали диско-диффузионным методом согласно МУК 4.2.2495-09 «Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия,

бруцеллез, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам» [4].

Конструирование праймеров и проведение ПЦР *in silico* осуществляли при помощи программ Primer3Plus и авторской программы VirtualPCR. Кластерный анализ и построение филогенетического дерева проводили с использованием программы GrapeTree (алгоритм NJ) [21]. Для оптимизации набора VNTR-локусов с целью получения максимального числа индивидуальных генотипов была использована программа AuSeTTS (Automated Selection of Typing Target Subsets) [17]. Для подтверждения подвидовой принадлежности применяли метод INDEL-типирования [8].

Для детекции VNTR-локусов ПЦР проводили отдельно для каждого из 5 локусов. Температура отжига составляла 55 °С для всех локусов (M3, M6, M10, M20A, M24) [9]. В реакции были использованы праймеры в нашей модификации, направленной на уменьшение целевого фрагмента. Продукты амплификации анализировали в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) и определяли размер амплифицированных фрагментов по стандарту молекулярных масс с помощью программы «Quantity One».

Для определения генотипов еще 19 штаммов *F. tularensis* подвида *mediasiatica* были использованы данные GenBank и MLVAbank. Сведения о штаммах подвида *mediasiatica* представлены в таблице 1.

Таблица 1

Сведения о штаммах подвида *mediasiatica*, представленных в данном исследовании

№	штамм	Место выделения	Источник	Год выделения	Подвид
1	FSC147	Казахстан	нд	нд	<i>mediasiatica</i>
2	543	Казахстан	полуденная песчанка	1965	<i>mediasiatica</i>
3	122	нд	клещи <i>R. pumilio</i>	1973	<i>mediasiatica</i>
4	120	Казахстан	заяц	1965	<i>mediasiatica</i>
5	150	Казахстан	заяц	1969	<i>mediasiatica</i>
6	60 (60B-57)	Узбекистан	клещи <i>Hyaloma</i>	1960	<i>mediasiatica</i>
7	A-61	Узбекистан	клещи <i>Hyaloma</i>	1960	<i>mediasiatica</i>
8	148	Казахстан	человек	1968	<i>mediasiatica</i>
9	425	Казахстан	нд	1983	<i>mediasiatica</i>
10	9A	Алтай	клещи <i>D. silvarum</i>	2022	<i>mediasiatica</i>
11	23A	Алтай	клещи <i>H. concinna</i>	2022	<i>mediasiatica</i>
12	87A	Алтай	клещи <i>H. concinna</i>	2022	<i>mediasiatica</i>
13	90A	Алтай	клещи <i>D. silvarum</i>	2022	<i>mediasiatica</i>
14	91A	Алтай	клещи <i>D. silvarum</i>	2022	<i>mediasiatica</i>
15	95A	Алтай	клещи <i>D. silvarum</i>	2022	<i>mediasiatica</i>
16	96A	Алтай	клещи <i>D. silvarum</i>	2022	<i>mediasiatica</i>

17	281A	Алтай	ил	2022	<i>mediasiatica</i>
18	A137	Altay_Obol*	клещи <i>H. concinna</i>	2014	<i>mediasiatica</i>
19	A139	Altay_Obol	клещи <i>H. concinna</i>	2014	<i>mediasiatica</i>
21	A142K	Altay_Obol	клещи <i>H. concinna</i>	2014	<i>mediasiatica</i>
22	A142M	Altay_Obol	клещи <i>H. concinna</i>	2014	<i>mediasiatica</i>
23	A174	Altay_Obol	клещи <i>H. concinna</i>	2014	<i>mediasiatica</i>
24	A176	Altay_Obol	клещи <i>D. silvarum</i>	2014	<i>mediasiatica</i>
25	A187	Altay_Obol	клещи <i>H. concinna</i>	2013	<i>mediasiatica</i>
26	A188	Altay_Obol	клещи <i>H. concinna</i>	2013	<i>mediasiatica</i>
27	A199	Altay_Obol	клещи <i>D. silvarum</i>	2014	<i>mediasiatica</i>
28	A343	Altay_Obol	клещи <i>H. concinna</i>	2013	<i>mediasiatica</i>
29	A373	Altay_Obol	клещи <i>D. silvarum</i>	2013	<i>mediasiatica</i>
30	A554	Altay_Obol	клещи <i>H. concinna</i>	2011	<i>mediasiatica</i>
31	A678	Altay_Obol	клещи <i>Ix. persulcatus</i>	2011	<i>mediasiatica</i>
32	A82	Altay_Obol	клещи <i>D. silvarum</i>	2014	<i>mediasiatica</i>
33	A823	Altay_Obol	рыжая полевка	2011	<i>mediasiatica</i>
34	A84	Altay_Obol	клещи <i>D. silvarum</i>	2014	<i>mediasiatica</i>
35	A99	Altay_Obol	клещи <i>H. concinna</i>	2013	<i>mediasiatica</i>

Примечание: * – штаммы, выделенные в Алтайском крае в 2011–2014 гг.

Результаты и обсуждение

При изучении выделенных культур с помощью традиционных микробиологических методов (культурально-морфологические, биохимические, антигенные свойства) было определено, что все выделенные культуры относятся к виду *F. tularensis*. С помощью разработанных ранее биохимических экспресс-тестов дополнительно проведена внутривидовая дифференциация культур [6, 10, 11]. Установлено, что все выделенные штаммы относились к виду *F. tularensis* подвида *mediasiatica*.

Для подтверждения подвидовой принадлежности был применен метод INDEL-типирования, предложенный нами ранее [7, 8]. Из 13 пар праймеров для детекции INDEL-маркеров были подобраны две пары совместимых праймеров, позволяющих в одной реакции специфически определять подвиды исследуемых штаммов (табл. 2, рис. 1).

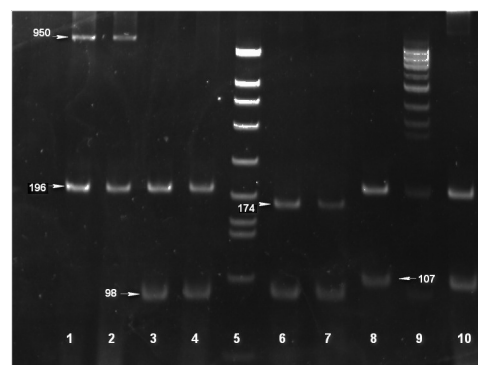


Рис. 1. Дифференциация штаммов *F. tularensis* разных подвидов в мультипраймерной ПЦР: 1, 2 – подвид *holarctica*, 3, 4 – подвид *tularensis*, 5, 9 – ДНК маркер, 6, 7 – подвид *mediasiatica*, и 8, 10 – подвид *novicida*. Стрелки указывают позиции аллелей 98, 107 и 950 п.н. для гена *ft1779* и аллелей 174 и 196 п.н. для гена *ft426*. Лунки 5 и 9 маркерная ДНК

Таблица 2

Соответствие размеров ампликонов и принадлежности к определенному подвиду изученных штаммов

Подвид	Размер ампликона для INDEL-локуса, п.н.	
	<i>ft1779</i>	<i>ft426</i>
<i>novicida</i>	107	196
<i>holarctica</i>	950/0	196
<i>tularensis</i>	98	196
<i>mediasiatica</i>	98	174

Метод успешно используется для быстрого определения подвида как вновь выделенных, так и музейных штаммов возбудителя туляремии. Так, у всех изученных Алтайских штаммов был обнаружен набор аллелей для INDEL-локусов *ft1779* (98 п.н.) и *ft426* (174 п.н.) специфичный для штаммов подвида *mediasiatica*.

Филогенетическая характеристика штаммов *F. tularensis* подвида *mediasiatica*

Для выявления филогенетических связей штаммов из природных очагов Средней Азии и Алтайского края, выделенных в разное время (см. табл. 1) было проведено

MLVA- типирование по 5 VNTR-локусам. (M3, M6, M10, M20A, M24).

Для сравнения в исследование были включены 12 штаммов подвида *tularensis* как наиболее близкого в эволюционном плане [14]. Кластерный анализ VNTR генотипов 47 штаммов проводили с помощью программы GarreTree, результаты представлены на рисунке 2.

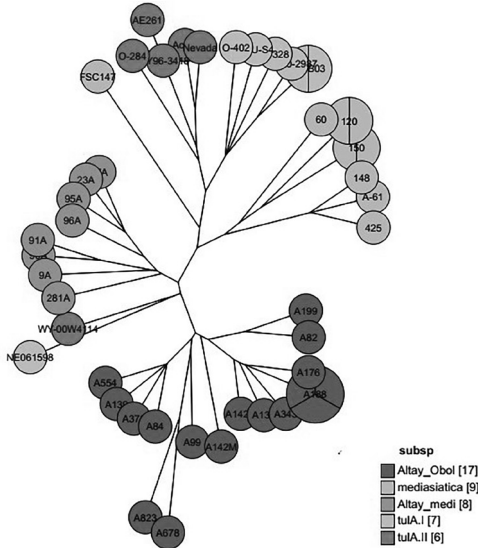


Рис. 2. Филогенетическое дерево VNTR-генотипов 35 штаммов *F. tularensis* подвида *mediasiatica* и 13 штаммов подвида *tularensis*, построенное по алгоритму NJ (в легенде в скобках указано число штаммов данной группы)

В результате кластерного анализа наблюдается разделение штаммов по подвидам и по группам штаммов внутри подвигов, тем не менее позиция трех штаммов (WY-00W4114, FSC147 и NE061598) относительно подвигов остается неопределенной. Возможно, это связано с ограничением, присущем MLVA, — с риском ошибочной оценки родства между штаммами на больших генетических расстояниях. Высокая вариабельность MLVA-маркеров может вызывать эффекты гомоплазии, то есть долю мутационных изменений по причинам, отличным от общего происхождения [15]. INDEL- маркеры проявляют более низкую степень полиморфизма и, следовательно, могут быть использованы при создании иерархической схемы типирования наряду с методом MLVA, тем более, что оба метода основаны на ПЦР-детекции специфичных фрагментов ДНК, и таким образом экономятся время и затраты на исследование. Включение в схему типирования 5 INDEL-маркеров для дифференциации подвигов *F. tularensis* [7] обеспечивает четкое разделение штаммов по подвидам и группам внутри подвигов (рис. 3).

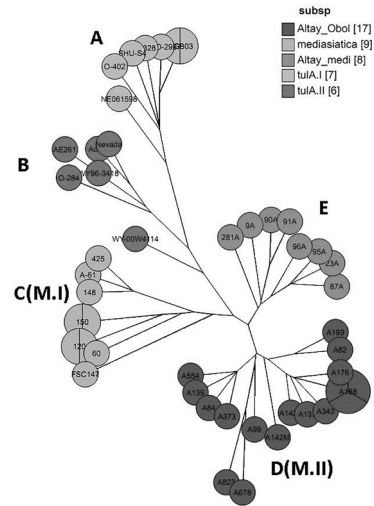


Рис. 3. Филогенетическое дерево INDEL/VNTR-генотипов 35 штаммов *F. tularensis* подвида *mediasiatica* и 13 штаммов подвида *tularensis*, построенное по алгоритму NJ (в легенде в скобках указано число штаммов данной группы)

Генотипы изученных штаммов формируют пять отдельных кластеров (А, В, С, D и Е), соответствующих подвидам и группам внутри подвигов. Кластер А представлен штаммами *F. tularensis* подвида *tularensis*A.I, а кластер В — штаммами *F. tularensis* подвида *tularensis*A. II, соответственно. Кластер С состоит из штаммов, выделенных в Средней Азии и полностью совпадает с группой М.I по классификации [18]. Кластер D, представляющий группу М.II, формируют штаммы, выделенные на территории Алтайского края в 2011–2015 гг. [18]. Неожиданным является тот факт, что штаммы, выделенные в Алтайском крае в 2022 г., собраны в отдельном кластере Е, входящем в общий массив штаммов подвида *mediasiatica*. Еще одной особенностью распределения является присутствие штаммов 60 (60В-57) и А-61, выделенных в Узбекистане в 1960 г., в общем кластере среднеазиатских штаммов С(М.I), тогда как по данным других авторов [18], штамм 60В-57 представляет отдельную генетическую линию М.III. Взаимное расположение кластеров подвида *tularensis* (А,В) и подвида *mediasiatica* (С–Е) сходно с результатами MST-типирования по 9737 SNPs [18], а состав кластеров С и D практически совпадает с таковым для М.I и М.II [19].

Таким образом, разные методы филогенетического анализа приводят к весьма сходным результатам. Можно предположить, что расположение штаммов, выделенных в Алтайском крае в 2022 г., в отдельном кластере Е не случайно и отражает реальные генетические различия штаммов, разделенных по времени выделения. Следует отметить достаточно высокое генетическое разнообразие штаммов

подвида *mediasiatica* — 31 индивидуальный генотип у 35 изученных штаммов с коэффициентом разнообразия $DI=0.99$.

Заключение

С помощью методов VNTR и INDEL-типирования проведено сравнительное изучение выборки штаммов *F. tularensis* подвида *mediasiatica*, выделенных в разное время в Алтайском крае и штаммов из Средней Азии из коллекции нашего института, совместно с группой из 13 штаммов подвида *tularensis*. Комплексный подход позволил разделить все изученные штаммы на пять кластеров с дифференциацией двух подгрупп (А.І и А.ІІ) в подвиде *tularensis* и трех подгрупп у подвида *mediasiatica*. Показана высокая степень генетического разнообразия штаммов подвида *mediasiatica*, что ранее было затруднительно из-за небольшого количества доступных штаммов *F. tularensis* подвида *mediasiatica*.

Литература

1. Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С., Кудрявцева Т.Ю., Уланова Г.И., Карбышева С.Б., Миронова Р.И. и др. Выделение среднеазиатского подвида туляремийного микроба на территории Алтайского края // Проблемы особо опасных инфекций. — 2013. — № 1. — С. 66–69.
2. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. — М.: Медицина, 1975. — 192 с.
3. Олсуфьев Н.Г., Мещерякова И.С. Внутривидовая таксономия возбудителя туляремии *Francisella tularensis* // Журнал гигиены, эпидемиологии, микробиологии, иммунологии. — 1982. — № 26. — С. 291–299.
4. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сальмонеллез, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам. Методические указания МУК 4.2.2495—09. — М.: 2009.
5. Павлович Н.В., Мишанькин Б.Н. Прозрачная питательная среда для культивирования *Francisella tularensis* // Антибиотики и медицинская биотехнология. — 1987. — № 32(2). — С. 133–137.
6. Родионова И.В. Дифференциация географических рас *Francisella tularensis* на основании активности цитруллинуреидазы // Лабораторное дело. — 1970. — № 1. — С. 42–43.
7. Сорокин В.М., Водопьянов А.С., Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Дифференциация подвидов *Francisella tularensis* методом INDEL типирования // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 2022. — № 99(2). — С. 193–201.
8. Сорокин В.М., Водопьянов А.С., Павлович Н.В., Цимбалистова М.В. Способ определения подвидов *Francisella tularensis* методом мультипраймерной ПЦР. Патент на изобретение 2765495 С1, 31.01.2022.
9. Сорокин В.М., Павлович Н.В., Водопьянов А.С., Цимбалистова М.В., Писанов Р.В., Носков А.К. Молекулярно-генетические методы типирования: филогенетическая характеристика штаммов *Francisella tularensis* различного происхождения // Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными заболеваниями на юге России. Ермолевские чтения. — 2022. — С. 301–306.
10. Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Фосфатазная активность у представителей рода *Francisella* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 1998. — № 1. — С. 10–13.
11. Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Особенности формирования устойчивости *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* к β-лактамам антибиотикам // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 2014. — № 1. — С. 3–8.
12. Эпидемиологический надзор за туляремией: Методические указания МУ 3.1.2007-05. — М.: 2005.
13. Aikimbaev M.A. Taxonomy of the genus *Francisella* // Rep Acad Sci Kaz SSR Ser Biol. — 1966. — Vol. 5. — P. 42–44.
14. Keim P., Johansson A., Wagner D.M. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella* // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2007. — Vol. 1105. — P. 30–66.
15. Keys C., Kemper S., Keim P. Highly diverse variable number tandem repeat loci in the *E. coli* O157:H7 and O55:H7 genomes for high-resolution molecular typing // J. Appl. Microbiol. — 2005. — Vol. 98(4). — P. 928–940.
16. Olsufjev N.G., Meshcheryakova I.S. Subspecific taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912 // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1983. — Vol. 33. — P. 872–874.
17. O'Sullivan M.V., Sintchenko V. and Gilbert G.L. Software for selecting the most informative sets of genomic loci for multi-target microbial typing // BMC bioinformatics. — 2013. — Vol. 14(1). — P. 1–8. doi:10.1186/1471-2105-14-148.
18. Timofeev V., Bakhteeva I., Titareva G., Kopylov P., Christiany D., Mokrievich A., et al. Russian isolates enlarge the known geographic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*. // PLoS ONE. — 2017. — Vol. 12(9). — e0183714. doi:10.1371/journal.pone.0183714.
19. Timofeev V., Bakhteeva I., Mokrievich A., Vakhrameeva G., Gritskova E., Anisimov Yu., et al. The first finding of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* in Krasnoyarsk Territory, Siberia, and an update of the subspecies genetic diversity // Bacteria. — 2022. — Vol. 1. — P. 242–250.
20. Vogler A.J., Keys C., Nemoto Y., Colman R.E., Jay Z., Keim P. Effect of repeat copy number on variable-number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157:H7 // J. Bacteriol. — 2006. — Vol. 188. — P. 4253–4263.
21. Zhou Z., Alikhan N.F., Sergeant M.J., Luhmann N., Vaz C., Francisco A.P., et al. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens // Genome research. — 2018. — Vol. 28(9). — P. 1395–1404.

References

- Mokriyevich AN, Timofeyev VS, Kudryavtseva TYU, Ulanova GI, Karbysheva SB, Mironova RI i dr. Vydeleniye sredneaziatskogo podvida tulyaremiynogo mikroba na territorii Altayskogo kraya. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2013; 1:66–69 (in Russian).
- Olsuf'yev NG. Taksonomiya, mikrobiologiya i laboratornaya diagnostika vozбудitelya tulyaremii. Moscow: Meditsina, 1975: 192 (in Russian).
- Olsuf'yev NG, Meshcheryakova IS. Vnutrividovaya taksonomiya vozбудitelya tulyaremii *Francisella tularensis*. Zhurnal gigiyeny, epidemiologii, mikrobiologii, immunologii 1982; 26:291–299 (in Russian).
- Opredeleniye chuvstvitel'nosti vozбудiteley opasnykh bakterial'nykh infektsiy (chuma, sibirskaya yazva, kholera, tulyaremiya, brutsellez, sap, melioidoz) k antibakterial'nym preparatam. Metodicheskiye ukazaniya MUK 4.2.2495—09. Moscow: 2009 (in Russian).
- Pavlovich NV, Mishan'kin BN. Prozhnaya pitatel'naya sreda dlya kul'tivirovaniya *Francisella tularensis*. Antibiotiki i meditsinskaya biotekhnologiya 1987; 32(2):133–137 (in Russian).
- Rodionova IV. Differentsiatsiya geograficheskikh ras *Francisella tularensis* na osnovanii aktivnosti tsitrullinureidazy. Laboratornoye delo 1970; 1:42–43 (in Russian).
- Sorokin VM, Vodop'yanov AS, Tsimbalistova MV, Pavlovich NV. Differentsiatsiya podvidov *Francisella tularensis* metodom INDEL tipirovaniya. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 2022; 99(2):193–201 (in Russian).
- Sorokin VM, Vodop'yanov AS, Pavlovich NV, Tsimbalistova MV. Sposob opredeleniya podvidov *Francisella tularensis* metodom mul'tipraymernoy PTSR. Patent na izobreteniy 2765495 C1, 31.01.2022 (in Russian).
- Sorokin VM, Pavlovich NV, Vodop'yanov AS, Tsimbalistova MV, Pisanov RV, Noskov AK. Molekulyarno-geneticheskiye metody tipirovaniya: filogeneticheskaya kharakteristika shtammov *Francisella tularensis* razlichnogo proiskhozhdeniya. Aktual'nyye voprosy epidemiologicheskogo nadzora za infektsionnymi i parazitarnymi zabollevaniyami na yuge Rossii. Yermol'yevskiy chteniya. 2022:301–306 (in Russian).
- Tsimbalistova MV, Pavlovich NV. Fosfataznaya aktivnost' u predstaviteley roda *Francisella*. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 1998; 1:10–13 (in Russian).
- Tsimbalistova MV, Pavlovich NV. Osobennosti formirovaniya ustoychivosti *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* k β-laktamnym antibiotikam. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 2014; 1:3–8 (in Russian).
- Epidemiologicheskii nadzor za tulyaremiyey: Metodicheskiye ukazaniya MU 3.1.2007-05. Moscow: 2005 (in Russian).
- Aikimbaev MA. Taxonomy of the genus *Francisella*. Rep Acad Sci Kaz SSR Ser Biol 1966; 5:42–44.
- Keim P, Johansson A, Wagner DM. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. Ann NY Acad Sci 2007; 1105:30–66.
- Keys C, Kemper S, Keim P. Highly diverse variable number tandem repeat loci in the *E. coli* O157:H7 and O55:H7 genomes for high-resolution molecular typing. J Appl Microbiol 2005; 98(4):928–940.
- Olsuf'ev NG, Meshcheryakova IS. Subspecific taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912. Int J Syst Bacteriol 1983; 33:872–874.
- O'Sullivan MV, Sintchenko V and Gilbert GL. Software for selecting the most informative sets of genomic loci for multi-target microbial typing. BMC bioinformatics 2013; 14(1):1–8. doi:10.1186/1471-2105-14-148.
- Timofeev V, Bakhteeva I, Titareva G, Kopylov P, Christiany D, Mokrievich A, et al. Russian isolates enlarge the known geographic diversity of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*. PLoS ONE 2017; 12(9):e0183714. doi:10.1371/journal.pone.0183714.
- Timofeev V, Bakhteeva I, Mokrievich A, Vakhrameeva G, Gritskova E, Anisimov Yu, et al. The first finding of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* in Krasnoyarsk Territory, Siberia, and an update of the subspecies genetic diversity. Bacteria 2022; 1:242–250.
- Vogler AJ, Keys C, Nemoto Y, Colman RE, Jay Z, Keim P. Effect of repeat copy number on variable-number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157:H7. J Bacteriol 2006; 188:4253–4263.
- Zhou Z, Alikhan NF, Sergeant MJ, Luhmann N, Vaz C, Francisco AP, et al. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. Genome research 2018; 28(9):1395–1404.

GENETIC DIVERSITY OF *FRANCISELLA TULARENSIS* SUBSPECIES *MEDIASIATICA*

V.M. SOROKIN¹, N.V. PAVLOVICH¹, M.V. TSIMBALISTOVA¹, A.S. VODOPYANOV¹,
R.V. PISANOV¹, G.KH. BAZAROVA², E.N. ROZHDESTVENSKY², A.K. NOSKOV¹

¹Rostov-on-Don Plague Control Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don;

²Altai anti-plague station of Rospotrebnadzor, Gorno-Altaysk

The *mediasiatica* subspecies is the least studied due to the availability of only single strains of this subspecies for research. In recent years, the situation has changed due to the isolation of strains of the *mediasiatica* subspecies in the Altai Territory of the Russian Federation. The aim of the study was to compare the phylogenetic characteristics of *F. tularensis* strains isolated at different times in the Altai Territory and strains from Central Asia from the collection of our institute. For tularemia pathogen genotyping, VNTR and INDEL typing methods were used. A comparative study of a sample of strains of *F. tularensis* subspecies *mediasiatica* isolated at different times in the Altai Territory and strains from Central Asia from the collection of our institute was carried out together with a group of 13 strains of the subspecies *tularensis*. An integrated approach made it possible to divide all the studied strains into five clusters with the differentiation of two subgroups (A.I and A.II) in the subspecies *tularensis* and three subgroups in the subspecies *mediasiatica*. A high degree of genetic diversity of strains of the subspecies *mediasiatica* was shown, which was previously difficult due to the small number of available strains of *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*.

Keywords: *Francisella tularensis*, ssp. *mediasiatica*, INDEL typing, VNTR typing, phylogenetics.

Address:

Sorokin V.M., Ph.D.
senior researcher, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute
of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don,
E-mail: soroka53@mail.ru

Для цитирования:

Сорокин В.М., Павлович Н.В., Цимбалистова М.В., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Базарова Г.Х., Рождественский Е.Н., Носков А.К. Генетическое разнообразие штаммов *Francisella tularensis* subspecies *mediasiatica*. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(4):21–27.

For citation:

Sorokin V.M., Pavlovich N.V., Tsimbalistova M.V., Vodopyanov A.S., Pisanov R.V., Bazarova G.Kh., Rozhdestvensky E.N., Noskov A.K. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subspecies *mediasiatica*. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(4):21–27 (in Russian).

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА КОРМОВЫХ ДОБАВОК НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ РОДА *RHODOTORULA*, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ ОБЪЕКТОВ АКВАКУЛЬТУРЫ

Е.М. ПАНЧИШИНА, Н.Л. КОРНИЕНКО*

ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет»,
Владивосток

Микробиологическая оценка качества кормовых добавок на основе дрожжей рода *Rhodotorula* китайских производителей в рамках данного исследования показала неоднозначные результаты, на основе которых установлено отсутствие их экологичности и безопасности для объектов аквакультуры, обусловленное, вероятно, режимами транспортировки и хранения. Методом определения общего микробного числа кормовой добавки на основе *Rhodotorula benthica* установлено превышение нормативных значений исследуемого показателя, которое составило $1,0 \times 10^9$ КОЕ/г. Определение жизнеспособных клеток кормовой добавки на основе *Rhodotorula fujiensis* выявило присутствие микрофлоры, не характерной заявленной производителем. Исследуемые кормовые добавки соответствуют требованиям ГОСТ 20083 «Дрожжи кормовые», которым регламентируется отсутствие микроба-продуцента. Исследование морфологических признаков при микроскопировании жидкой кормовой добавки позволило установить фактическое содержание живых дрожжевых клеток, что свидетельствует о её пробиотической направленности. Биотестирование с помощью тест-культуры *Tetrahymena pyriformis* показало высокую биологическую ценность кормовых добавок и отсутствие их токсичности.

Ключевые слова: кормовые добавки, оценка качества, биотестирование, дрожжи, *Rhodotorula benthica*, *Rhodotorula fujiensis*.

Введение

Традиционно основным кормовым ресурсом, производимым в РФ, считается кормовая мука [1, 2]. Экспертами в области кормопроизводства отмечено, что существует зависимость отечественной аквакультуры от импорта кормовой продукции (премиксы, пробиотики и кормовые добавки и др.) [5, 7, 11].

Известно, что синтезируемый дрожжами микробный протеин по усвояемости и содержанию аминокислот превосходит протеин животного происхождения, повышает биологическую ценность белков других кормов. Белок кормовых дрожжей переваривается в организме животных на 95%. Попытки по их использованию в кормлении водных биоресурсов проводятся по всему миру [9, 12–14, 17], и сегодня в этом продукте заинтересованы крупные международные компании [4, 16].

В России на марифермах для культивирования водных биоресурсов успешно применяют кормовые пробиотические добавки на основе красных дрожжей рода *Rhodotorula* (в виде сухого порошка, либо жидкого концентрата), произведенные в Китае, что вызывает зависимость от китайских производителей [6].

Серьезной проблемой для отрасли аквакультуры является обеспечение экологически чистых и безопасных кормов. В связи с этим целью настоящей работы стала оценка качества кормовых добавок на основе дрожжей рода *Rhodototula*. Для реализации поставленной цели необходимо решить следующие задачи: установить фактическое состояние объекта и сопоставить полученную информацию с установленными требованиями для определения соответствия, то есть получение вторичной информации.

Материалы и методы

Объектами исследований стали пробиотические кормовые добавки (КД), характеристика, которых (информация от производителя) представлена в таблице 1 и на рисунке 1.

© 2023 г. Панчишина Е.М., Корниенко Н.Л.

* Автор для переписки:

Корниенко Надежда Леонидовна

к.т.н., заведующий лабораторией микробиологии кафедры Технология продуктов питания, ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет»

E-mail: kornienkonl@mail.ru

Характеристика исследуемых объектов

Наименование кормовой добавки (КД)	Производитель	Состав	Условное обозначение
Морские красные дрожжи « <i>Rhodotorula benthica</i> » (рис. 1а)	Shandong Baolai Lilai Biological Engineering Co, China	Дрожжи <i>R. benthica</i> (80 млрд. кл/г), астаксантин 600 мкг/г.	КД сухая
Добавка « <i>Rhodotorula fujianensis</i> » (рис. 1б)	Даляньский центр разработки водных кормов Цзяолун	Дрожжи <i>Rhodotorula fujianensis</i> (15 млрд. кл/мл)	КД жидкая



Рис. 1. Внешний вид товарной упаковки кормовых добавок

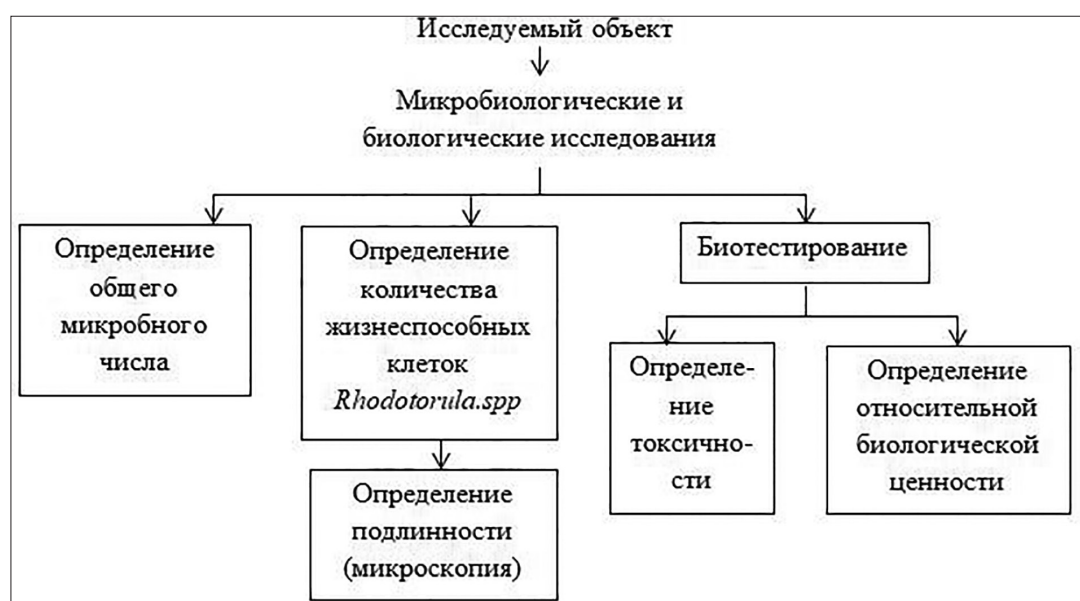


Рис. 2. Схема оценки качества исследуемых объектов

Органолептические свойства кормовых добавок (внешний вид, цвет) определяли визуально. Навеску сухих дрожжей помещали на гладкую чистую белую поверхность, и рассматривали, при естественном свете, осторожно перемешивая. Жидкие дрожжи помещали в стеклянную пробирку и рассматривали на белом фоне при естественном освещении.

Оценку качества исследуемых пробиотических кормовых добавок по микробиологическим и биологи-

ческим показателям проводили согласно схеме, представленной на рисунке 2.

Микробиологический анализ проводили по ГОСТ Р 55291, ГОСТ 20083, ГОСТ 31928, ГОСТ 10444. Определяли чистоту кормовых добавок по показателю общего микробного числа (ОМЧ) и количество жизнеспособных дрожжевых клеток.

Микроскопические исследования. Для изучения морфологии выделенных микроорганизмов готовили

фиксируемый препарат и окрашивали метиленовым синим, с последующим микропированием при увеличении $\times 100$ раз с помощью микроскопа Микмед-5.

Культуральные особенности роста на плотных питательных средах оценивали визуально.

В работе применяли ускоренный метод биотестирования исследуемых объектов путем оценки токсичности и относительной биологической ценности с использованием инфузории *Tetrahymena pyriformis* [10].

Результаты и обсуждение

Органолептическая оценка показала, что кормовая добавка «*Rhodotorula benthica*» представляет собой сыпучий порошок розового цвета. Жидкая добавка «*Rhodotorula fujianensis*» – двухфазная суспензия, верхний слой которой составлял 60% от общего объема, а нижний – 40%. Верхняя фаза жидкая, мутная, соломенно-желтого цвета, нижняя – густая биомасса темно-розового цвета.

Результаты микробиологического анализа исследуемых кормовых добавок внесены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты микробиологического анализа

Наименование исследуемого образца	Контролируемый показатель	Нормативное значение	Фактическое содержание
КД сухая	ОМЧ, КОЕ/г, не более	$3,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^9$
КД жидкая			$1,6 \times 10^5$
КД сухая	Количество жизнеспособных клеток <i>Rhodotorula</i> spp., КОЕ/г, не менее; заявленное производителем	$8,0 \times 10^{10}$	Отсутствие роста
КД жидкая			$3,1 \times 10^7$

В ходе исследований получены неудовлетворительные результаты микробиологической чистоты кормовой добавки на основе *R. benthica*, то есть при определении общего микробного числа, фактическое содержание которого превысило нормативное на один порядок (10^3), выявлен преобладающий рост спорообразующих бактерий (рис. 3а). ОМЧ кормовой добавки, содержащей *R. fujianensis* находится в пределах регламентируемых значений (рис. 3б).

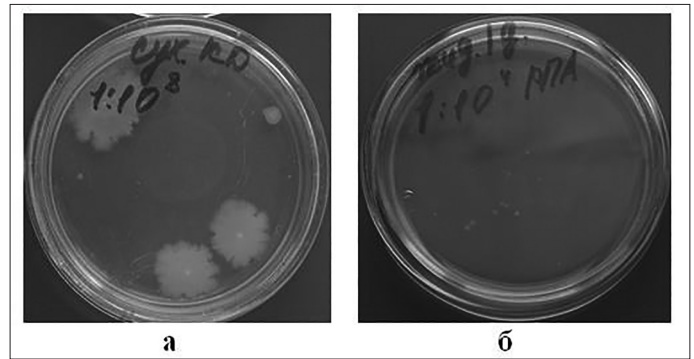


Рис. 3. Результаты определения ОМЧ исследуемых кормовых добавок: а – сухая КД; б – жидкая КД

Результаты определения жизнеспособных клеток *Rhodotorula* spp. коррелируют с показателями микробиологической чистоты кормовых добавок.

Так, при посеве на агаризованную среду Сабуро сухой кормовой добавки, наблюдался рост споровой микрофлоры (рис. 4а), которая, вероятно, проявила антагонистическое действие по отношению к дрожжевым клеткам; при этом наблюдался и мицелий плесневых грибов (рис. 4б).

При посеве жидкой кормовой добавки на основе *R. fujianensis* для определения жизнеспособных дрожжевых клеток культуральный рост на среде Сабуро отмечен образованием мелких колоний с ровными четкими контурами (единичные колонии чечевицеобразные) от кремового до бежевого цвета. При этом рост наблюдался в глубине агара, что характерно для факультативно-анаэробных форм микроорганизмов (рис. 5). Отмечен кисломолочный запах посевного материала. Описанные культуральные особенности роста выделенных микроорганизмов не характерны для дрожжей рода *Rhodotorula* spp. [8].

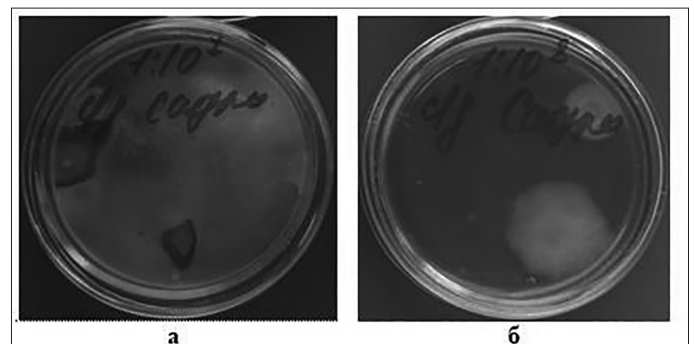


Рис. 4. Результаты определения жизнеспособности дрожжевых клеток сухой КД на основе *R. benthica*

При определении подлинности дрожжевых клеток приготовили препарат для изучения морфологических

признаков; для этого отобрали чашки Петри, на которых выросли изолированные колонии. В результате при микроскопировании мазка обнаружены клетки, имеющие форму

прямых, бесспорных палочек, собранных в цепочки различной длины, расположенных одиночно и попарно (рис. 6), не характерные для дрожжей.

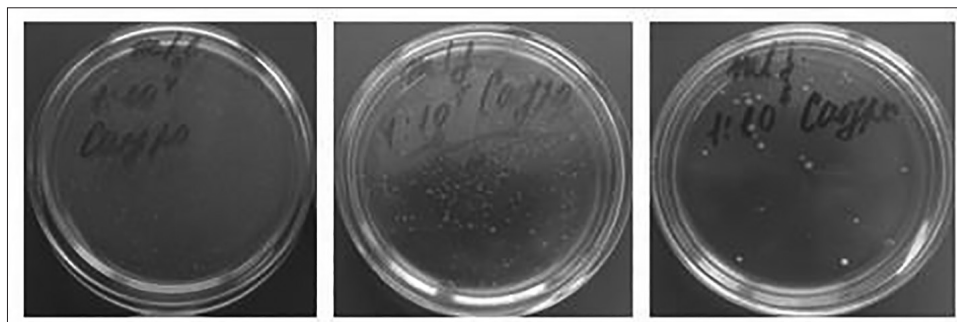


Рис. 5. Результаты определения жизнеспособности дрожжевых клеток жидкой КД на основе *R. fujianensis*



Рис. 6. Микроскопическая картина определения подлинности дрожжевых клеток. Окрашивание метиленовым синим, увеличение $\times 100$

Таким образом, по результатам микроскопических исследований и выявленных культуральных особенностей роста микроорганизмов нами установлено, что живых дрожжевых клеток в жидкой кормовой добавке не обнаружено. Полученные результаты не согласуются с данными микроскопирования самой кормовой добавки, где выявлены живые клетки дрожжей (окрашено ядро) круглой и эллиптической формы (рис. 7).

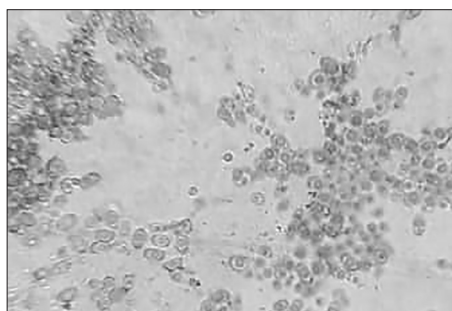


Рис. 7. Микроскопическая картина жидкой кормовой добавки. Окрашивание метиленовым синим, увеличение $\times 100$

Методом Лоури [15] определили массовую долю белка в исследуемых объектах, которая составила для сухой КД – 50%, жидкой КД – 56%. На основе полученных результатов осуществили пробоподготовку для проведения анализа по биотестированию.

Результаты наблюдений в ходе тестирования кормовых добавок на протяжении 7 суток, которое проводили в соответствии с рекомендациями Шульгина Ю.П. и др. [10], продемонстрировали отсутствие основных показателей, характеризующих поведение и характер роста, таких как угнетение подвижности, деформации клеток инфузорий и их гибель (рис. 8). Оценка токсичности свидетельствует о безопасности исследуемых кормовых добавок, что соответствует требованиям нормативных документов.

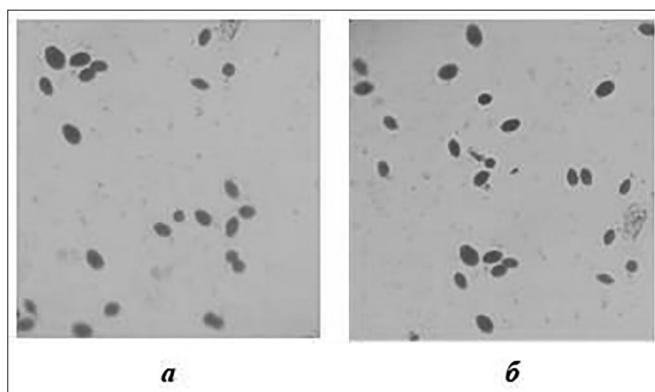


Рис. 8. Клетки инфузорий *Tetrahymena pyriformis* на средах, содержащих исследуемые КД. Фиксация 5%-ым спиртовым раствором йода, увеличение $\times 10$: а – сухая КД; б – жидкая КД

Для определения относительной биологической ценности проводили подсчет количества клеток инфузорий в динамике (рис. 9) с помощью камеры Горяева.

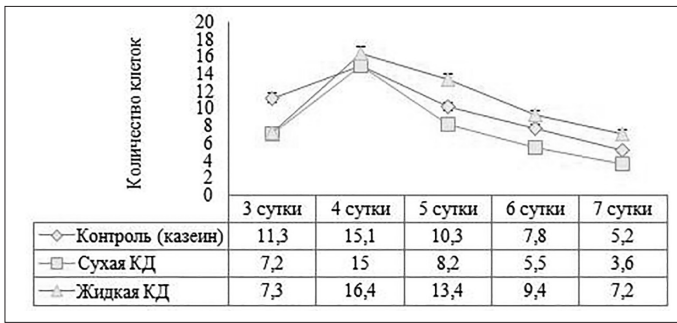


Рис. 9. Динамика роста клеток инфузории *Tetrahymena puriformis* на средах с исследуемыми объектами

Скорость роста численности индикаторного организма на средах, содержащих исследуемые кормовые добавки в первые 4 суток инкубации, свидетельствует о высокой биологической активности продуктов или их усваиваемости.

Определение биологической ценности исследуемых КД обнаружило высокие значения определяемого показателя относительно казеина (ОБЦ) (рис. 10).

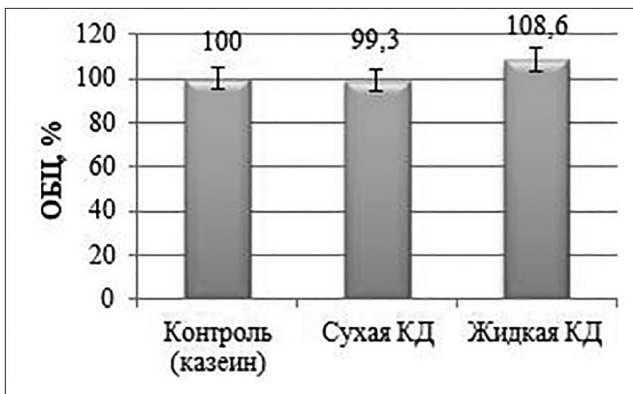


Рис. 10. Относительная биологическая ценность исследуемых кормовых добавок

Заключение

Оценка качества фактического состояния исследованных объектов (КД) дала неоднозначные результаты: установлено несоответствие представленным от производителя данным о количестве жизнеспособных дрожжевых клеток, входящих в состав КД, но отсутствие живых клеток продуцента, которое регламентируется ГОСТ 20083. Это позволяет сделать вывод о принадлежности исследуемых КД к кормовым дрожжам, а не к добавкам пробиотической направленности, как заявляет производитель. Выявленное в ходе оценки микробиологической чистоты несоответствие требованиям НД можно объяснить нарушением санитарно-технологических режимов производства или, что вероятнее всего, режимов транс-

портировки и хранения КД. Таким образом, полученная в ходе работы вторичная информация об исследованных КД позволяет сделать вывод об отсутствии их экологической чистоты и безопасности для объектов аквакультуры.

Несмотря на обнаруженную контаминацию посторонней микрофлорой КД на основе дрожжей *Rhodotorula* результаты биотестирования выявили отсутствие токсичности и высокую биологическую ценность.

Стоит отметить, что в ранее проведенных исследованиях авторами настоящей статьи выделена дрожжевая культура *Rhodotorula benthica* из сухой КД с предварительным этапом реактивации на средах обогащения [8], что свидетельствует о присутствии жизнеспособных клеток в КД, которые, вероятно, активизируются и проявляют свою пробиотическую направленность в условиях желудочно-кишечного тракта объектов аквакультуры [3].

*Работа выполнена при финансовой поддержке НИР №809/2022 «Научное обоснование способа получения кормовых препаратов пробиотической направленности на основе биомассы дрожжей *Rhodotorula benthica*, предназначенных для выращивания объектов аквакультуры».*

Литература

1. Агеев А.В. Состояние и перспективы мирового и отечественного производства кормов для объектов аквакультуры, производства и потребления рыбной муки // Рыбное хозяйство. — 2018. — № 4. — С. 92–95.
2. Артемов Р.В., Бурлаченко И.В., Бочкарев А.И., Баскакова Ю.А. О путях повышения качества кормовой рыбной муки для нужд аквакультуры в Российской Федерации // Труды ВНИРО. — 2019. — Т. 176. — С. 152–159.
3. Богатыренко Е.А. Пробиотики и их применение в марикультуре // Известия ТИНРО. — 2009. — Т. 157. — С. 189–196.
4. Ветров А., Афанасьева О., Артемов Р. Применение дрожжевого протеина в аквакультуре / Рыбная сфера (Рыба). — 2022. — № 1(27). — С. 24–25.
5. Волошин Г.А., Акимов Е.Б., Артемов Р.В., Гершунская В.В. Состояние и перспективы развития рынка комбикормов для индустриальной аквакультуры в Российской Федерации // Труды ВНИРО. — 2022. — Т. 190. — С. 163–169.
6. Головина Н.А., Романова Н.Н., Головин П.П. [и др.]. Анализ состояния и перспективные направления развития аквакультуры. — М.: Российский научно-исследовательский институт информации и технико-экономических исследований по инженерно-техническому обеспечению агропромышленного комплекса, 2019. — 88 с.

7. Михеев В.П. Производство кормов для аквакультуры в современной России // Теория и практика мировой науки. — 2019. — № 7. — С. 12–14.
8. Панчишина Е.М., Корниенко Н.Л., Шадрин Е.В. Изучение культуральных особенностей дрожжей *Rhodotorula benthica*, выделенных из пробиотической кормовой добавки // Научные труды Дальрыбвтуза. — 2020. — Т. 52. — № 2. — С. 5–11.
9. Салдеева К.А. Альтернативные источники протеина при производстве комбикормов для аквакультуры // Шаг в науку. — 2021. — № 3. — С. 116–119.
10. Шульгин Ю.П., Шульгина Л.В., Петров В.А. Ускоренная биотис оценка качества и безопасности сырья и продуктов из водных биоресурсов. — Владивосток: Изд-во ТГЭУ, 2006. — 131 с.
11. Эксперты из отрасли аквакультуры о состоянии отечественного кормопроизводства / Рыбная сфера (Рыба). — 2022. — № 1(27). — 64 с.
12. Ananphongmanee V., Lertpreedakorn N., Taengchaiyaphum S., Charoenrat T., Sritunyalucksana K., Boonchird C. Shrimp protected from a virus by feed containing yeast with a surface-displayed viral binding protein // J. Biotechnol. — 2021. — Vol. 342. — P. 45–53.
13. Barbosa J.C., Machado D., Borges S.C.F., Pintado M., & Gomes A.M. Sustainable protein sources: insects, algae and yeast / In G.W. Smithers (Ed.), Encyclopedia of food and safety. — Elsevier, 2023. — P. 262–272.
14. Huang W., Xiao X., Hu W., Tang T., Bai J., Zhao S., Ao Z., Wei Z., Gao W., Zhang W. Effects of dietary nucleotide and yeast cell wall on growth performance, feed utilization, anti-oxidative and immune response of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) // Fish Shellfish Immunol. — 2023. — Vol. 134. — Art. 108574. doi: 10.1016/j.fsi.2023.108574.
15. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folinphenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. — Vol. 193. — No. 1. — P. 265–275.
16. McLean E. Feed Ingredients for Sustainable Aquaculture / Sustainable Food Science — A Comprehensive Approach. Elsevier. — 2023. — P. 392–423. doi: 10.1016/B978-0-12-823960-5.00085-8.
17. Warwas N., Vilg J.V., Langeland M., Roques J.A.C., Hinchcliffe J., Sundh H., Undeland I., Sundell K. Marine yeast (*Candida sake*) cultured on herring brine side streams is a promising feed ingredient and omega-3 source for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Aquaculture. — 2023. — Vol. 571. — Art. 739448. doi: 10.1016/j.aquaculture.2023.739448.
2. Artemov RV, Burlachenko IV, Bochkarev AI, Baskakova YuA. O putyakh povysheniya kachestva kormovoy rybnoy muki dlya nuzhd akvakul'tury v Rossiyskoy Federatsii. Trudy VNIRO 2019; 176:152–159 (in Russian).
3. Bogatyrenko YeA. Probiotiki i ikh primeneniye v marikul'ture. Izvestiya TINRO 2009; 157:189–196 (in Russian).
4. Vetrov A, Afanas'yeva O, Artemov R. Primeneniye drozhzhevogo proteina v akvakul'ture. Rybnaya sfera (Ryba) 2022; 1(27):24–25 (in Russian).
5. Voloshin GA, Akimov YeB, Artemov RV, Gershunskaya VV. Sostoyaniye i perspektivy razvitiya rynka kombikormov dlya industrial'noy akvakul'tury v Rossiyskoy Federatsii. Trudy VNIRO 2022; 190:163–169 (in Russian).
6. Golovina NA, Romanova NN, Golovin PP [i dr.]. Analiz sostoyaniya i perspektivnyye napravleniya razvitiya akvakul'tury. Moscow: Rossiyskiy nauchno-issledovatel'skiy institut informatsii i tekhniko-ekonomicheskikh issledovaniy po inzhenerno-tekhnicheskomu obespecheniyu agropromyshlennogo kompleksa, 2019: 88 (in Russian).
7. Mikheyev VP. Proizvodstvo kormov dlya akvakul'tury v sovremennoy Rossii. Teoriya i praktika mirovoy nauki 2019; 7:12–14 (in Russian).
8. Panchishina YeM, Korniyenko NL, Shadrina YeV. Izucheniye kul'tural'nykh osobennostey drozhzhey *Rhodotorula benthica*, vydelennykh iz probioticheskoy kormovoy dobavki. Nauchnyye trudy Dal'rybvтуza 2020; 52(2):5–11 (in Russian).
9. Saldeyeva KA. Al'ternativnyye istochniki proteina pri proizvodstve kombikormov dlya akvakul'tury. Shag v nauku 2021; 3:116–119 (in Russian).
10. Shul'gin YuP, Shul'gina LV, Petrov VA. Uskorennaya biotis otsenka kachestva i bezopasnosti syr'ya i produktov iz vodnykh bioresursov. Vladivostok: Izd-vo TGEU, 2006: 131 (in Russian).
11. Eksperty iz otrasli akvakul'tury o sostoyanii otechestvennogo kormoproizvodstva. Rybnaya sfera (Ryba) 2022; 1(27): 64 (in Russian).
12. Ananphongmanee V, Lertpreedakorn N, Taengchaiyaphum S, Charoenrat T, Sritunyalucksana K, Boonchird C. Shrimp protected from a virus by feed containing yeast with a surface-displayed viral binding protein. J Biotechnol 2021; 342:45–53.
13. Barbosa JC, Machado D, Borges SCF, Pintado M, & Gomes AM. Sustainable protein sources: insects, algae and yeast. In GW Smithers (Ed), Encyclopedia of food and safety. Elsevier, 2023: 262–272.
14. Huang W, Xiao X, Hu W, Tang T, Bai J, Zhao S, Ao Z, Wei Z, Gao W, Zhang W. Effects of dietary nucleotide and yeast cell wall on growth performance, feed utilization, anti-oxidative and immune response of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Fish Shellfish Immunol 2023; 134:108574. doi: 10.1016/j.fsi.2023.108574.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folinphenol reagent. J Biol Chem 1951. 193(1):265–275.
16. McLean E. Feed Ingredients for Sustainable Aquaculture / Sustainable Food Science — A Comprehensive Approach.

References

1. Ageyev AV. Sostoyaniye i perspektivy mirovogo i otechestvennogo proizvodstva kormov dlya ob'yektov akvakul'tury, proizvodstva i potrebleniya rybnoy muki. Rybnoye khozyaystvo 2018; 4:92–95 (in Russian).

Elsevier 2023: 392–423. doi: 10.1016/B978-0-12-823960-5.00085-8.

17. Warwas N, Vilg JV, Langeland M, Roques JAC, Hinchcliffe J, Sundh H, Undeland I, Sundell K. Marine yeast (*Candida*

sake) cultured on herring brine side streams is a promising feed ingredient and omega-3 source for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 2023; 571:739448. doi: 10.1016/j.aquaculture.2023.739448.

EVALUATION OF THE QUALITY FEED ADDITIVES BASED ON YEAST GENUS *RHODOTORULA* INTENDED FOR THE CULTIVATION OF AQUACULTURE FACILITIES

E.M. PANCHISHINA, N.L. KORNIENKO

Far Eastern State Technical Fisheries University, Vladivostok

Microbiological assessment of the quality feed additives based on yeast genus *Rhodotorula* of Chinese manufacturers, within the framework this study, showed ambiguous results, on the basis which the lack of their environmental friendliness and safety for aquaculture facilities was established, probably due to the modes transportation and storage. The method determining the total microbial number of a feed additive based on *Rhodotorula benthica* established an excess normative values of the studied indicator, which amounted to 1.0×10^9 CFU/g. Determination viable cells of a feed additive based on *Rhodotorula fujianensis* revealed the presence microflora not characteristic declared manufacturer. The studied feed additives comply with the requirements of GOST 20083 «Feed yeast», which regulates the absence a producer microbe. The study morphological features by microscopy a liquid feed additive made it possible to establish the actual content of live yeast cells, which indicates it`s probiotic orientation. Biotesting using the *Tetrahymena pyriformis* test culture showed the high biological value of feed additives and the absence their toxicity.

Keywords: feed additives, quality assessment, biotesting, yeast, *Rhodotorula benthica*, *Rhodotorula fujianensis*

Address:

Kornienko N.L., Ph.D.

Head of the Microbiology Laboratory educational and laboratory complex of the Institute of Food Production of the Far Eastern State Technical Fisheries University
E-mail: kornienkonl@mail.ru

Для цитирования:

Панчишина Е.М., Корниенко Н.Л. Оценка качества кормовых добавок на основе дрожжей рода *Rhodotorula*, предназначенных для выращивания объектов аквакультуры. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(4):28–34.

For citation:

Panchishina E.M., Kornienko N.L. Evaluation of the quality feed additives based on yeast genus *Rhodotorula* intended for the cultivation of aquaculture facilities. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(4):28–34 (in Russian).

АНАЛИЗ ШТАММОВ *SALMONELLA ENTERICA* SPP., ИЗОЛИРОВАННЫХ В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ В 2022 ГОДУ

А.М. ГОРОХ*, А.А. ГЕРАСИМЕНКО, С.О. ВОДОПЬЯНОВ, А.С. ВОДОПЬЯНОВ

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

Цель исследования заключалась в изучении генетических особенностей штаммов *Salmonella enterica*, выделенных в Ростовской области в 2022 году из клинического материала и продуктов питания. В анализе применены методы полногеномного секвенирования с использованием биоинформационного анализа авторскими и сторонними программами. В результате исследовано 26 штаммов, которые были разделены на различные группы по принадлежности к серотипу, MLST-/INDEL-профилям, наличию генов патогенности. Среди изученных штаммов 20 принадлежали к серотипу *Enteritidis*, 3 — к *Muenchen* и по одному штамму — к серотипам *Kottbus*, *Bredeney*, *Typhimurium*. MLST-анализ позволил разделить штаммы на 5 ST-типов. Отмечено, что для большинства штаммов существует чёткая корреляция между ST-типом и серотипом. Проведённые INDEL- и филогенетический анализы выявили 5 уникальных генотипов, коррелирующих с определенными серотипами. Анализ по наличию/отсутствию генов патогенности дал возможность разделить штаммы *Salmonella enterica Enteritidis*, которые не классифицировались с помощью MLST-/INDEL-анализов, на 6 групп.

Ключевые слова: сальмонелла, факторы патогенности, генотипирование, серологический анализ, молекулярно-генетический анализ, сравнительный анализ.

Введение

В настоящее время заболеваемость острыми кишечными инфекциями в мире продолжает оставаться на высоком уровне. Большую долю в ней занимает сальмонеллёз [4].

Микроорганизмы рода *Salmonella* — неспорообразующие грамтрицательные подвижные палочки, способные вырабатывать энтеротоксины, а после гибели выделять эндотоксины (липополисахаридный комплекс). Основными патогенными факторами являются пили, Vi-антиген, белки наружной мембраны, резистентность к фагоцитозу; также каждый вид или подвид сальмонелл обладают разным набором токсинов.

Продолжающийся рост заболеваемости сальмонеллёзом во многих странах мира, увеличение числа выделяемых у животных и людей сероваров сальмонелл, контаминация сальмонеллами значительных объёмов пищевых продуктов животного происхождения и объ-

ёмов окружающей среды выдвигают эту инфекцию в ряд важнейших медицинских, экологических, социальных и ветеринарных проблем [10, 13].

Распространение сальмонелл в природе и разнообразии путей, которыми они проникают в организм человека и животных, объясняется их генетической пластичностью. Сальмонеллы легко находят экологические ниши и адаптируются к самым разнообразным условиям.

Высокая заболеваемость сальмонеллёзами, регистрируемая в большинстве стран мира, в том числе и в экономически развитых, существенное изменение в характере их распространения дают основание рассматривать сальмонеллёзы как одну из серьёзных современных проблем не только с медицинской точки зрения, но и с экономической. По мнению многих современных исследователей, истинное число заболеваний сальмонеллёзами значительно больше того, которое обычно ежегодно регистрируется. И статистические данные о ежегодной заболеваемости сальмонеллёзами в действительности меньше реально существующих в 10–20, а иногда и в 100 раз. Подавляющее число зарегистрированных в России сальмонеллёзов расшифровываются как спорадические. На вспышечную заболеваемость традиционно приходится только около 5% от всех официально зарегистрированных случаев этого инфекционного заболевания [6].

© 2023 г. Горох А.М., Герасименко А.А., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С.

* Автор для переписки:

Горох Алевтина Михайловна
младший научный сотрудник ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора
E-mail: gorokh_am@antiplague.ru

Генетическая гетерогенность и выраженная способность к полигостальной адаптации сальмонелл пока не дают реальных результатов управления сальмонеллезной инфекцией при помощи иммунопрофилактики в естественных резервуарах. Экологическая пластичность сальмонеллы позволяет ей адаптироваться к условиям массового применения antimicrobных препаратов не только в здравоохранении, но и в сельхозпроизводстве, что вызывает глобальное распространение антибиотико-резистентных штаммов и усиливает риск их переноса в организм человека [8, 9, 14].

Цель данного исследования заключалась в изучении генетических особенностей штаммов *Salmonella enterica*, выделенных в Ростовской области в 2022 году из клинического материала и продуктов питания.

Материалы и методы

В работе были использованы 26 штаммов *Salmonella enterica*, выделенных в 2022 году из проб клинического материала от больных острым гастроэнтеритом и из пищевой продукции. Были проведены молекулярно-генетические исследования изолированных штаммов. Геномную ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Библиотеку фрагментов ДНК готовили с использованием набора реагентов Illumina Nextera XT DNA Sample Prep Kit (Illumina, США) согласно инструкции производителя. Ампликоны метили с использованием Nextera XT Index Kit (Illumina, США). Секвенирование проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) с набором реагентов MiSeq Reagent Kit. Сборку геномов осу-

ществляли с помощью SPAdes v.3.15.4 с параметрами по умолчанию [11].

Разделение по серотипам, MLST-профиль, филогенетические данные получены с помощью пакета инструментов TORMES [12]. Гены патогенности и INDEL-маркеры найдены с помощью авторских программ FragmentExtractor и SalmonellaAnalyzer, написанных на языке Java [5].

Результаты и обсуждение

В 2022 году в Ростове-на-Дону зарегистрированы три крупные вспышки сальмонеллезной инфекции, во время которых было изолировано 26 штаммов. По результатам анализа по детерминантным генам были установлены серотипы исследуемых штаммов, с последующей интерпретацией результатов. Выборка штаммов была представлена тремя группами: восемь штаммов, выделенных в марте, пять из которых были изолированы от больных и три были получены из пищевых продуктов, являющихся источником распространения кишечной инфекции, принадлежали к одному серотипу — *Salmonella enterica Enteritidis*. Из 7 штаммов, изолированных из клинического материала от больных острым гастроэнтероколитом в августе, один был идентифицирован как *Salmonella enterica Bredeney*, один — как *Salmonella enterica Typhimurium*, один — как *Salmonella enterica Kottbus*, и четыре штамма — как *Salmonella enterica Enteritidis*. Из 11 штаммов, изолированных в октябре, 8 было идентифицировано как *Salmonella enterica Enteritidis* и 3 — как *Salmonella enterica Muenchen* (табл. 1).

Таблица 1

Серотипы изолированных штаммов *Salmonella enterica* spp.

Образец	Подвид	Серовар	Серогруппа	H1	H2	O антиген
Salm-1597-1608	<i>enterica</i>	<i>Bredeney</i>	B	l,v	1,7	1,4,12,27
Salm-2169-2180	<i>enterica</i>	<i>Kottbus</i>	C2-C3	e,h	1,5	6,8
Salm-2317-2328	<i>enterica</i>	<i>Typhimurium</i>	B	i	1,2	1,4,[5],12
Salm-1837-1848	<i>enterica</i>	<i>Enteritidis</i>	D1	g,m	-	1,9,12
Salm-1981-1984						
Salm-2109-2120						
Salm-2381-2392						
Se-235						
Se-2						

Se-481	<i>enterica</i>	<i>Enteritidis</i>	D1	g,m	-	1,9,12
Se-4						
Se-516						
Se-543						
Se-592						
Se-6						
S-ent-2965-2976						
S-ent-3125-3136						
S-ent-4229-4240						
S-ent-4417-4428						
S-ent-4509-4520						
S-ent-4521-4532						
S-ent-4533-4544						
S-ent-4581-4592						
S-ent-3205-3216						
S-ent-4377-4380						
S-ent-5177-5188						

Одним из традиционных методов генотипирования штаммов сальмонелл является мультилокусный анализ генов системы жизнеобеспечения (MultiLocus Sequence Typing, MLST). Варианты различных аллелей изучаемых генов обозначаются порядковыми номерами, а их сочетание образуют MLST (ST) тип [3]. Проведение MLST-анализа позволило разделить изучаемые штаммы на 5 ST-типов (табл. 2). При этом для подавляющего большинства штаммов отмечена четкая корреляция между ST-типом и серотипом. Исключение составил штамм S-ent-4581-4592, имеющий уникальное сочетание аллелей генов системы жизнеобеспечения, отсутствующий в международных базах данных, что не позволило определить его ST-тип.

Несмотря на широкое распространение метода MLST-типирования, он является довольно трудоёмким и требующим дорогостоящего импортного оборудования, что может составлять существенную проблему, особенно

в условиях санкционного режима против Российской Федерации. Это делает актуальной разработку более простых и импортонезависимых методов типирования. Одним из таких способов является INDEL-типирование, основанное на определении коротких вставок-делеций (INsertion-DELetion, INDEL) в различных генах. Проведение ПЦР с праймерами, фланкирующими место делеции-вставки, позволяет дифференцировать различные штаммы, исходя из размера получаемого ампликона. Данный метод уже хорошо зарекомендовал себя для генотипирования самых различных возбудителей, включая *Y. pestis*, *V. cholerae*, *F. tularensis* [1, 2, 7].

Для проведения INDEL-типирования нами были использованы 12 локусов. Проведённый анализ 26 штаммов *Salmonella enterica* spp. позволил выявить 5 уникальных генотипов, что коррелировало с анализом по серотипированию.

Таблица 2

MLST-профили изучаемых штаммов

	Серотип	ST	1	2	3	4	5	6	7
Salm-1597-1608	<i>Bredeney</i>	306	aroC(111)	dnaN(47)	hemD(49)	hisD(16)	purE(41)	sucA(15)	thrA(4)
Salm-2169-2180	<i>Kottbus</i>	212	aroC(10)	dnaN(71)	hemD(21)	hisD(12)	purE(15)	sucA(20)	thrA(18)
Salm-2317-2328	<i>Typhimurium</i>	313	aroC(10)	dnaN(7)	hemD(12)	hisD(9)	purE(112)	sucA(9)	thrA(2)

Salm-1837-1848	<i>Enteritidis</i>	11	aroC(5)	dnaN(2)	hemD(3)	hisD(7)	purE(6)	sucA(6)	thrA(11)
Salm-1981-1984									
Salm-2109-2120									
Salm-2381-2392									
Se-2									
Se-235									
Se-4									
Se-481									
Se-516									
Se-543									
Se-592									
Se-6	<i>Enteritidis</i>	11	aroC(5)	dnaN(2)	hemD(3)	hisD(7)	purE(6)	sucA(6)	thrA(11)
S-ent-2965-2976									
S-ent-3125-3136									
S-ent-4229-4240									
S-ent-4417-4428									
S-ent-4509-4520									
S-ent-4521-4532									
S-ent-4533-4544									
S-ent-4581-4592	<i>Enteritidis</i>	-	aroC(111)	dnaN(2)	hemD(3)	hisD(7)	purE(6)	sucA(6)	thrA(11)
S-ent-3205-3216	<i>Muenchen</i>	82	aroC(41)	dnaN(42)	hemD(43)	hisD(12)	purE(9)	sucA(12)	thrA(2)
S-ent-4377-4380									
S-ent-5177-5188									

Примечательно, что штамм *S. enterica Enteritidis* 4581-4592, для которого не был определен ST-тип, имел INDEL-генотип, совпадающий с таковым у остальных штаммов серотипа *Enteritidis* (см. Приложение 1).

В результате анализа встречаемости генов патогенности были взяты три гена для последующей дифференциации штаммов: *shdA* (регулирующий интенсивность выделения бактерий с фекалиями); *srgA* (отвечает за продукцию плазмид-кодируемых фимбрий) и *rck* (плазмидо-кодируемый ген, ответственный за

инвазию в нефагоцитарные клетки). Серовар *Bredeney* показал отсутствие в своем геноме генов патогенности. Штаммы *Salmonella enterica Enteritidis* разделились на 6 групп. Все штаммы серовара *Muenchen* и *Kottbus* имели генотип *rck-srgA-shdA+*. Изолят *Salmonella enterica Typhimurium* относился к генотипу *rck+srgA+shdA-*.

Был проведен филогенетический SNP-анализ выделенных штаммов. С его помощью было показано, что исследуемые штаммы разделились на 5 крупных кластеров (с небольшими отличиями внутри), соответствующих разделению по серотипам (рис. 1).

Таблица 3

Наличие/отсутствие генов патогенности *rck*, *srgA*, *shdA* у штаммов *Salmonella enterica*

Штамм	Серовар	Период выделения	<i>rck</i>	<i>srgA</i>	<i>shdA</i>
Se-235	<i>Enteritidis</i>	Март 2022 г.	+	+	+
Se-2	<i>Enteritidis</i>	Март 2022 г.	-	+	+
Se-481					
Se-4					
Se-592					
Se-516	<i>Enteritidis</i>	Март 2022 г.	+	-	+
Se-543	<i>Enteritidis</i>	Март 2022 г.	+	+	-
Se-6	<i>Enteritidis</i>	Март 2022 г.	-	+	-
Salm-1597-1608	<i>Bredeney</i>	Август 2022 г.	-	-	-

Salm-1837-1848	<i>Enteritidis</i>	Август 2022 г.	+	-	+
Salm-1981-1984	<i>Enteritidis</i>	Август 2022 г.	-	+	+
Salm-2109-2120	<i>Enteritidis</i>	Август 2022 г.	+	+	-
Salm-2169-2180	<i>Kottbus</i>	Август 2022 г.	-	-	+
Salm-2317-2328	<i>Typhimurium</i>	Август 2022 г.	+	+	-
Salm-2381-2392	<i>Enteritidis</i>	Август 2022 г.	+	+	+
S-ent-2965-2976	<i>Enteritidis</i>	Октябрь 2022 г.	-	+	+
S-ent-3125-3136					
S-ent-4581-4592					
S-ent-4509-4520					
S-ent-3205-3216	<i>Muenchen</i>	Октябрь 2022 г.	-	-	+
S-ent-4377-4380					
S-ent-5177-5188					
S-ent-4229-4240	<i>Enteritidis</i>	Октябрь 2022 г.	-	-	+
S-ent-4417-4428	<i>Enteritidis</i>	Октябрь 2022 г.	+	-	+
S-ent-4521-4532	<i>Enteritidis</i>	Октябрь 2022 г.	+	+	+
S-ent-4533-4544	<i>Enteritidis</i>	Октябрь 2022 г.	-	+	-

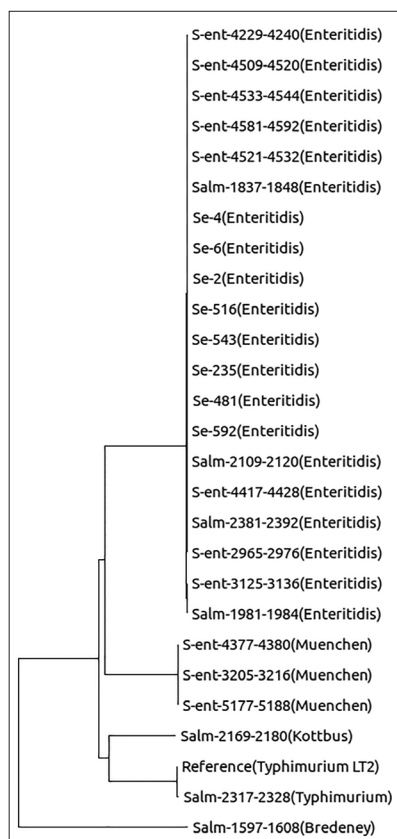


Рис. 1. Филогенетический анализ выделенных штаммов *Salmonella enterica*

Заключение

Проведенный анализ штаммов *Salmonella enterica* spp., выделенных в Ростовской области из клинического материала и продуктов питания в 2022 году, показал, что:

1. Исследуемые штаммы относились к серотипам: *Bredeney* (один штамм), *Kottbus* (один штамм),

Typhimurium (один штамм), *Muenchen* (три штамма), *Enteritidis* (двадцать штаммов).

2. Штаммы с серотипом *Enteritidis* имели идентичные MLST и INDEL-профили.

3. Отличительные особенности серотипа *Bredeney* — отсутствие генов *rck*, *srgA* и *shdA*. Штамм с серотипом *Kottbus* имел среди референтных единственный ген *shdA*. Штамм с серотипом *Typhimurium* не имел ген *shdA* с наличием всех остальных генов.

4. По филогенетическому анализу выяснено, что разделение исследуемых штаммов коррелирует с разделением их по серотипам.

5. Анализ по трем генам патогенности позволил разделить штаммы *Salmonella enterica Enteritidis*, ранее не дифференцирующиеся стандартными методами генотипирования.

Литература

1. 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.
2. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Трухачев А.Л., Олейников И.П., Демидова Г.В., Мишанькин Б.Н. Разработка метода дифференцировки *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis* на основе INDEL-маркеров // Современные аспекты изучения особо опасных и других инфекционных заболеваний: материалы научно-практической конференции, посвященной 80-летию Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института, Ростов-на-Дону, 20 ноября 2014 года. — Ростов-на-Дону: ООО «ЛПИ», 2014. — С. 147–150.
3. Егорова С.А., Кулешов К.В., Кафтырева Л.А. Современные методы субтипирования сальмонелл при расследо-

вании вспышек сальмонеллеза // Иммунопатология, аллергия, инфектология. — 2019. — № 3. — С. 36–42.

4. Куликовский А. Сальмонеллез: мониторинг необходим // Животноводство России. — 2015. — № 6. — С. 17–18.
5. Патент на изобретение RU 2786577 C1, заявка № 2022110382 от 18.04.2022. Способ молекулярно-генетического типирования штаммов сальмонелл по INDEL-маркерам. Зулькарнеев Э.Р., Водопьянов А.С., Лаишевцев А.М., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Горох А.М., Алешкин А.В., Капустин А.В., Багандова К.М., Мизаева Т.Э., Киселева И.А., Ефимова О.Г., Шастин П.Н., Супова А.В., Хабарова А.В., Савинов В.А., Якимова Э.А., Гулюкин А.М.
6. Рожнова С.Ш., Фролочкина Т.И., Головинова М.А. Эпидемиологическая ситуация по сальмонеллезам в России на рубеже веков / Материалы VIII съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. — 2002. — Т. 1. — С. 91–92.
7. Сорокин В.М., Водопьянов А.С., Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Дифференциация подвидов *Francisella tularensis* методом INDEL-типирования // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2022. — № 2. — С. 193–202.
8. Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Гурьев А.С., Маянский Н.А. Стратегии выживания бактерий в условиях контакта с антибиотиками // Клиническая лабораторная диагностика. — 2020. — Т. 65. — № 2. — С. 116–121.
9. Economou V., Gousia P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria // Infection and drug resistance. — 2015. — Vol. 8. — P. 49–61.
10. Jackson B.R., Griffin P.M., Cole D., Walsh K.A., Chai S.J. Outbreak-associated *Salmonella enterica* serotypes and food commodities, United States, 1998–2008 // Emerging infectious diseases. — 2013. — Vol. 19. — No. 8. — P. 1239–1244.
11. Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D., Lapidus A., Korobeynikov A. Using SPAdes De Novo Assembler // Current Protocols in Bioinformatics. — 2020. — Vol. 70. — No. 1. — Art. e102. doi: 10.1002/cpbi.102.
12. Quijada N.M., Rodríguez-Lázaro D., Eiros J.M., Hernández M. TORMES: an automated pipeline for whole bacterial genome analysis // Bioinformatics. — 2019. — Vol. 35. — No. 21. — P. 4207–4212.
13. Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Widdowson M.A., Roy S.L., Jones J.L., Griffin P.M. Foodborne illness acquired in the United States — major pathogens // Emerging infectious diseases. — 2011. — Vol. 17. — No. 1. — P. 7–15.
14. Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B.T., Levin S.A., Robinson T.P., Teillant A., Laxminarayan R. Global trends in antimicrobial use in food animals // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2015. — Vol. 112. — No. 18. — P. 5649–5654.

References

1. 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).
2. Vodop'yanov AS, Vodop'yanov SO, Trukhachev AL, Oleynikov IP, Demidova GV, Mishan'kin BN. Razrabotka metoda differentsirovki *Yersinia pestis* i *Yersinia pseudotuberculosis* na osnove INDEL-markerov. Sovremennyye aspekty izucheniya osobo opasnykh i drugikh infeksionnykh zabolevaniy: materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 80-letiyu Rostovskogo-na-Donu nauchno-issledovatel'skogo protivochumnogo instituta, Rostov-na-Donu, 20 noyabrya 2014 goda. Rostov-na-Donu: OOO «LPI», 2014:147–150 (in Russian).
3. Egorova SA, Kuleshov KV, Kaftyreva LA. Sovremennyye metody subtipirovaniya sal'monell pri rassledovanii vspyshek sal'monelleza. Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya 2019; 3:36–42 (in Russian).
4. Kulikovskiy A. Sal'monellez: monitoring neobkhdim. Zhitovnovodstvo Rossii 2015; 6:17–18 (in Russian).
5. Patent na izobreteniyе RU 2786577 C1, zayavka № 2022110382 ot 18.04.2022. Sposob molekulyarno-geneticheskogo tipirovaniya shtammov sal'monell po INDEL-markeram. Zulkarneev ER, Vodopyanov AS, Laishvtsev AM, Pisanov RV, Vodopyanov SO, Gorokh AM, Aleshkin AV, Kapustin AV, Bagandova K M, Mizaeva TE, Kiseleva IA, Efimova OG, Shastin PN, Supova AV, Khabarova AV, Savinov VA, Yakimova EA, Gulyukin AM (in Russian).
6. Rozhnova SSh, Frolochkina TI, Golovinova MA. Epidemiologicheskaya situatsiya po sal'monellozam v Rossii na rubezhe vekov. Materialy VIII s'yezda Vserossiyskogo obshchestva epidemiologov, mikrobiologov i parazitologov 2002; 1:91–92 (in Russian).
7. Sorokin VM, Vodop'yanov AS, Tsimbalistova MV, Pavlovich NV. Differentsiatsiya podvidov *Francisella tularensis* metodom INDEL-tipirovaniya. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 2022; 2: 193–202 (in Russian).
8. Chebotar' IV, Bocharova YuA, Gur'yev AS, Mayanskiy NA. Strategii vyzhivaniya bakteriy v usloviyakh kontakta s antibiotikami. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika 2020; 65(2):116–121 (in Russian).
9. Economou V, Gousia P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. Infection and drug resistance 2015; 8:49–61.
10. Jackson BR, Griffin PM, Cole D, Walsh KA, Chai SJ. Outbreak-associated *Salmonella enterica* serotypes and food commodities, United States, 1998–2008. Emerging infectious diseases 2013; 19(8):1239–1244.
11. Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Korobeynikov A. Using SPAdes De Novo Assembler. Current Protocols in Bioinformatics 2020; 70(1):e102. doi: 10.1002/cpbi.102.

12. Quijada NM, Rodríguez-Lázaro D, Eiros JM, Hernández M. TORMES: an automated pipeline for whole bacterial genome analysis. *Bioinformatics* 2019; 35(21):4207–4212.
13. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States — major pathogens. *Emerging infectious diseases* 2011; 17(1):7–15.
14. Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015; 112(18):5649–5654.

Приложение 1

	STY4288	STY3837	STY1159	STY0523	STY0257	STY2730	STY3176	STY3528	STY2140	STY0865	STY1371	STY1478	Серотип
Salm-1597-1608	85 п.о.	-	-	115 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	104 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	81 п.о.	77 п.о.	<i>Bredeney</i>
Salm-2169-2180	85 п.о.	100 п.о.	74 п.о.	125 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	104 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	81 п.о.	77 п.о.	<i>Kottbus</i>
Salm-2317-2328	85 п.о.	100 п.о.	74 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	99 п.о.	104 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	81 п.о.	77 п.о.	<i>Typhimurium</i>
Salm-1837-1848	97 п.о.	89 п.о.	92 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	98 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	75 п.о.	62 п.о.	<i>Enteritidis</i>
Salm-1981-1984	97 п.о.	89 п.о.	92 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	98 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	63 п.о.	81 п.о.	77 п.о.	
Salm-2109-2120	97 п.о.	89 п.о.	92 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	98 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	75 п.о.	62 п.о.	
Salm-2381-2392	97 п.о.	89 п.о.	92 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	98 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	75 п.о.	62 п.о.	
Se-2	97 п.о.	89 п.о.	92 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	98 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	75 п.о.	62 п.о.	
Se-4	97 п.о.	89 п.о.	92 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	98 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	75 п.о.	62 п.о.	
Se-6	97 п.о.	89 п.о.	92 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	98 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	75 п.о.	62 п.о.	
Se-235	97 п.о.	89 п.о.	92 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	98 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	75 п.о.	62 п.о.	
Se-481	97 п.о.	89 п.о.	92 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	98 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	75 п.о.	62 п.о.	
Se-516	97 п.о.	89 п.о.	92 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	98 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	75 п.о.	62 п.о.	
Se-543	97 п.о.	89 п.о.	92 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	98 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	75 п.о.	62 п.о.	
Se-592	97 п.о.	89 п.о.	92 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	98 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	75 п.о.	62 п.о.	
S-ent-2965-2976	97 п.о.	89 п.о.	92 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	98 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	75 п.о.	62 п.о.	
S-ent-3125-3136	97 п.о.	89 п.о.	92 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	98 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	63 п.о.	81 п.о.	77 п.о.	
S-ent-4229-4240	97 п.о.	89 п.о.	92 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	98 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	75 п.о.	62 п.о.	
S-ent-4417-4428	97 п.о.	89 п.о.	92 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	98 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	75 п.о.	62 п.о.	
S-ent-4509-4520	97 п.о.	89 п.о.	92 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	98 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	75 п.о.	62 п.о.	
S-ent-4521-4532	97 п.о.	89 п.о.	92 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	98 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	75 п.о.	62 п.о.	
S-ent-4533-4544	97 п.о.	89 п.о.	92 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	98 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	75 п.о.	62 п.о.	
S-ent-4581-4592	97 п.о.	89 п.о.	92 п.о.	127 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	98 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	75 п.о.	62 п.о.	
S-ent-3205-3216	85 п.о.	100 п.о.	74 п.о.	115 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	104 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	81 п.о.	77 п.о.	<i>Muenchen</i>
S-ent-4377-4380	85 п.о.	100 п.о.	74 п.о.	115 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	104 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	81 п.о.	77 п.о.	
S-ent-5177-5188	85 п.о.	100 п.о.	74 п.о.	115 п.о.	80 п.о.	105 п.о.	104 п.о.	102 п.о.	132 п.о.	69 п.о.	81 п.о.	77 п.о.	

ANALYSIS OF *SALMONELLA ENTERICA* SPP. STRAINS, ISOLATED IN ROSTOV REGION IN 2022

A.M. GOROKH, A.A. GERASIMENKO, S.O. VODOPYANOV, A.S. VODOPYANOV

Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute» of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don

The aim of the research was to study the genetic characteristics of *Salmonella enterica* strains isolated in the Rostov region in 2022 from clinical material and food. Methods of genome-wide sequencing using bioinformatic analysis by author's and third-party programs were used. As a result, 26 strains were studied, which were divided into different groups by belonging to the serotype, MLST/INDEL profiles, and the presence of pathogenicity genes. Among the studied strains, 20 belonged to the *Enteritidis* serotype, 3 to *Muenchen* and by each one strain to the *Kottbus*, *Bredeney*, *Typhimurium* serotypes respectively. MLST analysis allowed us to divide the strains into 5 ST-types. It is noted that for most strains there is a clear correlation between ST-type and serotype. INDEL and

phylogenetic analyses revealed 5 unique genotypes correlating with certain serotypes. Analysis of the presence/absence of pathogenicity genes allowed us to divide *Salmonella enterica* Enteritidis strains that were not classified using MLST/INDEL assays into 6 groups.

Keywords: *Salmonella*, factors of pathogenicity, genotyping, serological analysis, molecular genetic analysis, comparative analysis.

Address:

Gorokh A.M.

junior researcher of the Rostov-on-Don Scientific Research

Antiplague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don,

E-mail: gorokh_am@antiplague.ru

Для цитирования:

Горох А.М., Герасименко А.А., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С. Анализ штаммов *Salmonella enterica* spp., изолированных в Ростовской области в 2022 году. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(4):35–42.

For citation:

Gorokh A.M., Gerasimenko A.A., Vodopyanov S.O., Vodopyanov A.S. Analysis of *Salmonella enterica* spp. strains, isolated in Rostov region in 2022. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(4):35–42 (in Russian).

ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ЗАПАДНОГО НИЛА

А.В. ЕЛХОВА*, Е.В. ПИМЕНОВА, А.Ю. МАЧНЕВА, Т.В. ЗАМАРИНА,
А.Т. ЯКОВЛЕВ, И.В. НОВИЦКАЯ

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, Волгоград

Методом гибридной технологии получена панель моноклональных антител (МКА) к вирусу Западного Нила (ВЗН). МКА были охарактеризованы в методе иммунодиффузии в геле и в иммуноферментном анализе (ИФА) для определения специфичности. Антигенные белковые фракции ВЗН были изучены методом электрофореза в полиакриламидном геле. Результаты иммунохимической характеристики МКА свидетельствуют об их специфичном связывании с антигенами ВЗН, однако требуется дальнейшее исследование антител для определения их эпитопной направленности и возможности использования для конструирования диагностических тест-систем.

Ключевые слова: моноклональные антитела, вирус Западного Нила.

Введение

Вирус Западного Нила относится к семейству *Flaviviridae*, в состав которого входит ряд патогенных для человека вирусов: Японского энцефалита, денге, Зика, жёлтой лихорадки [14]. На территории России: в Астраханской, Волгоградской областях и Краснодарском крае — описаны вспышки лихорадки Западного Нила, во время которых были выявлены тяжёлые менингиты и менингоэнцефалиты с летальностью до 10% [1–3, 12]. Эпидемиологический анализ даёт основание предположить дальнейшее расширение ареала и активацию природных очагов ВЗН на территории Российской Федерации [4].

Выявление антигена ВЗН позволяет проследить циркуляцию среди основных носителей, переносчиков и людей. Для обнаружения антигена ВЗН в биоматериалах широко используют иммунологические методы исследования, в частности, иммуноферментный анализ в формате «сэндвич» на основе поликлональных и моноклональных антител [11, 15].

На сегодняшний день для практического использования доступна коммерческая тест-система иммуноферментная для выявления антигена вируса Западного Нила на основе поликлональных кроличьих

антител (ЗАО «Биосервис», номер регистрационного удостоверения ФСР 2012/13840 от 10.09.2012). Однако поликлональные препараты могут содержать иммуноглобулины, демонстрирующие перекрёстную реактивность с различными эпитопами других флавивирусов, что значительно влияет на специфичность диагностического набора [13].

Гибридная технология способствует созданию уникальной биотехнологической базы в виде препаратов моноклональных антител для исследования патогенных биологических агентов. МКА, продуцируемые одной гибридной, взаимодействуют только с одной антигенной детерминантой и имеют абсолютно одинаковую аффинность, что делает их более подходящими для выявления любых, в том числе вирусных, антигенов [8].

На территории РФ зарегистрированы штаммы гибридных клеток животного *Mus musculus* L. 5Н6 и L. 9Е2, которые являются продуцентами моноклональных антител к оболочечному белку вируса Западного Нила и депонированы в Коллекции клеточных культур ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». В ЗАО «Вектор-Бест» совместно с ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» разработана экспериментальная тест-система «Вектор-Западный Нил-антиген», созданная на основе полученных МКА. Однако, ввиду того, что каждый набор МКА обладает индивидуальными, неповторимыми свойствами, получение широкой панели МКА к ВЗН имеет большое значение для изучения антигенов флавивирусов и идентификации вирусных штаммов [5, 6].

Цель нашей работы — получение МКА к вирусу Западного Нила и характеристика их иммунохимических свойств.

© 2023 г. Елхова А.В., Пименова Е.В., Мачнева А.Ю., Замарина Т.В., Яковлев А.Т., Новицкая И.В.

* Автор для переписки:

Елхова Анна Владимировна
н.с. лаб. иммунологии ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
E-mail: n.u.s.h.k.a@mail.ru

Материалы и методы

Получение и очистка МКА. Самок мышей линии BALB/c (в возрасте 5 недель) иммунизировали антигенным препаратом ВЭН штамма СИЕН-1 с последующей гибридизацией иммунных спленоцитов и миеломных клеток Sp 2/0 в соотношении 1:3. Гибридомы, секретирующие специфичные антитела, были клонированы секторальным методом. Для накопления МКА *in vivo* клетки в объеме 0,5 мл из концентрации $2 \cdot 10^6$ – $5 \cdot 10^6$ кл/мл вводили внутрибрюшинно линейным мышам BALB/c, и спустя 2–3 недели по мере ее накопления осуществляли отбор асцитической жидкости.

Культуральные супернатанты и ациты мышей для осаждения иммуноглобулинов обрабатывали раствором сульфата аммония (50% насыщения) одно- и трехкратно соответственно. Осадок белков отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 минут, разводили в физиологическом растворе и диализовали. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

С целью контроля сохранения гибридами специфической антителопродукции каждый этап работы сопровождался ИФА-тестированием как образцов среды из лунок пластин или культуральных матрасцев, так и проб асцитических жидкостей и выделенных из них иммуноглобулинов.

ИФА. Иммуноферментный анализ выполняли в непрямом варианте по стандартной методике [7]. В качестве твердой фазы использовали пластины высокой сорбции (Corning-Costar, США). Доза сенситина составляла 1 мкг белка/лунку. В качестве конъюгата использовали диагностические антитела против IgG (H+L) белой мыши, меченные пероксидазой, отечественного производства (ФБУН НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ).

Результаты реакции регистрировали с помощью спектрофотометра вертикального сканирования SunriseTM (Tecan, Австрия) при длине волны 492 нм.

Изотипирование МКА. Типирование классов и подклассов МКА проводили с использованием набора реагентов Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Реакция иммунодиффузии (РИД). Ее выполняли по общепринятой методике [9]. В центральную лунку вносили антигенный комплекс ВЭН штамма СИЕН-1, периферические лунки заполняли препаратами моноклональных иммуноглобулинов. Все образцы были стандартизированы по концентрации белка. Результаты оценивали через 24–48 часов по наличию или отсутствию между лунками с образцами компонентов реакции линий преципитата.

Электрофорез (ЭФ). Электрофорез антигенных образцов проходил в денатурирующих условиях [10] в ячейке прибора «Mini-Trans-Blot» (Bio-Rad Laboratories, США). Окрашивание геля проводили раствором Кумаси R-250 и набором «Silver Straining kit, protein» (GE Healthcare, США). В качестве контрольного образца использован цельновирионный антиген из набора реагентов «Векто-Нил-IgM» (АО «Вектор-Бест», Россия). Расчёт молекулярной массы белков, входящих в состав антигенных препаратов ВЭН, осуществляли согласно инструкции к набору маркёров Precision Plus ProteinTM Unstained Standards Strep-tagged recombinant (Bio-Rad Laboratories, США).

Результаты и обсуждение

Нами для выполнения работы всего отобрано 49 клеток – предшественников гибридом, из которых три (C₂, C₈, H₇) являлись наиболее активными продуцентами антител по результатам скрининга в ИФА.

Оценка результатов прививаемости гибридом *in vivo* и расчёт показателей объемов получаемых асцитов приведены в таблице 1.

Таблица 1

Прививаемость различных гибридом *in vivo*

Наименование гибридомы-продуцента МКА	Показатель прививаемости гибридом <i>in vivo</i> , в процентах (%)	Объем полученных АЖ, в мл (M±σ)
C ₂	88	6,0±1,44
C ₈	73,6	4,17±0,26
H ₇	77,2	3,05±0,51
средние величины	79,6	4,4±0,73

Примечание: 1. АЖ – асцитическая жидкость; 2. M – средняя арифметическая величина; 3. σ – стандартное отклонение

Приведенные данные свидетельствуют о высокой степени прививаемости гибридных клеток (79,6%) и среднем уровне асцитобразования ($4,4 \pm 0,73$). Наиболее активной с точки зрения способности вызывать асцит у мышей являлась гибридома C_2 (88%).

С целью быстрого восстановления функции антителопродукции и пролиферативных свойств, а также освобождения от ревертантных клеток каждую из гибридом последовательно реклонировали, отмечая лунки с ростом единичных клонов, и анализировали их антителопродуцирующую активность. В результате проделанной работы нами была получена панель из 25 субклонов гибридом, продуцирующих МКА к ВЗН. Реакция изотипирования показала, что все выделенные МКА принадлежат классу IgM, что в последующем может иметь определенное значение при конструировании тест-систем, основанных на формировании агглютинационной решетки.

Часть субклонов оказалась нестабильной и, по мере последовательного ведения и накопления клеток в среде культивирования, было отмечено снижение их антителопродуцирующей активности, в связи с чем в нашей работе были выбраны и использованы для тиражирования субклоны, иммунологические свойства которых оставались неизменными (6 из 25). Это субклоны: C_2A_6 , C_2A_7 , C_2E_2 , C_8F_4 , $H_7E_{12}D_{10}A_8$, $H_7E_{12}D_1$.

Было установлено, что образцы культуральной (КЖ) и асцитической жидкости (АЖ) субклонов клеточных линии C_2 , C_8 и H_7 специфически взаимодейвали с ВЗН штамма СИЕН-1 (табл. 2).

Таблица 2

Характеристика полученных образцов МКА к антигену вируса Западного Нила штамма СИЕН-1 в ИФА

Наименование МКА	Специфическая активность МКА против ВЗН, полученных:	
	in vitro	in vivo
C_2A_6	1:12800	1:32000
C_2A_7	1:16000	1:128000
C_2E_2	1:25600	1:512000
C_8F_4	1:8000	1:16000
$H_7E_{12}D_1$	1:800	1:3200
$H_7E_{12}D_{10}A_8$	1:800	1:3200

Как следует из табличных данных, титры МКА, накопленных *in vitro* и *in vivo*, составляли, согласно результатам ИФА, от 1:800 до 1:25600 и от 1:3200 до 1:512000 соответственно. При этом наиболее высокий уровень антителообразования отмечен у субклонов гибридомы C_2 , в то время как субклоны H_7 оказались наименее активными.

Для сравнительного изучения антигенной направленности полученных МКА использовали РИД (рис. 1). Характер линий полученных преципитатов свидетельствует в пользу однонаправленности МКА к одному поверхностному эпитопу ВЗН. При этом активность субклонов гибридом C_2 (периферические лунки 1, 2, 3) и C_8 (лунка 6), линии преципитатов от которых явно смещены к центру, в значительной степени превышает активность МКА, вырабатываемых гибридомой H_7 (лунки 4, 5).

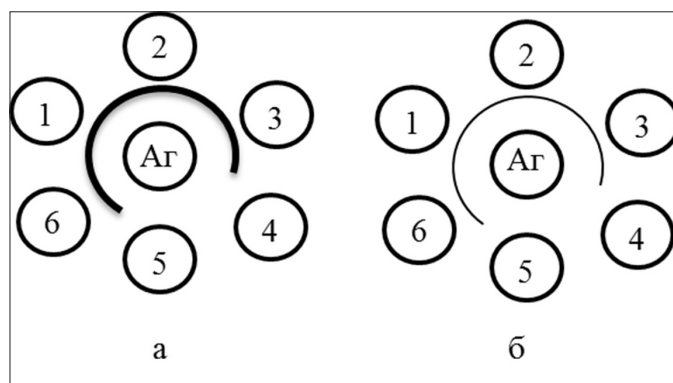


Рис. 1. Результаты РИД с МКА к ВЗН, полученными из асцитических жидкостей (а) и среды культивирования гибридом (б). В периферические лунки внесены МКА субклонов: 1 – C_2A_7 , 2 – C_2E_2 , 3 – C_2A_6 , 4 – $H_7E_{12}D_{10}$, 5 – $H_7E_{12}D_{10}A_8$, 6 – C_8F_4 . В центральных лунках розеток – антиген ВЗН штамма СИЕН-1

Полученные результаты коррелируют с данными ИФА, однако, в связи с разной чувствительностью методов РИД и ИФА, несомненно, не могут носить идентичный характер.

При помощи электрофореза в полиакриламидном геле провели сравнительное изучение антигенных комплексов ВЗН штамма СИЕН-1, используемого в качестве иммуногена при выполнении отдельных этапов гибридомной технологии, и очищенного антигена, предлагаемого АО «Вектор-Бест» в качестве положительного контроля коммерческих ИФА-тест-систем.

При изучении белкового профиля антигенных препаратов вируса Западного Нила в ходе электрофоретического разделения были получены фракции различных молекулярных масс (рис. 2).

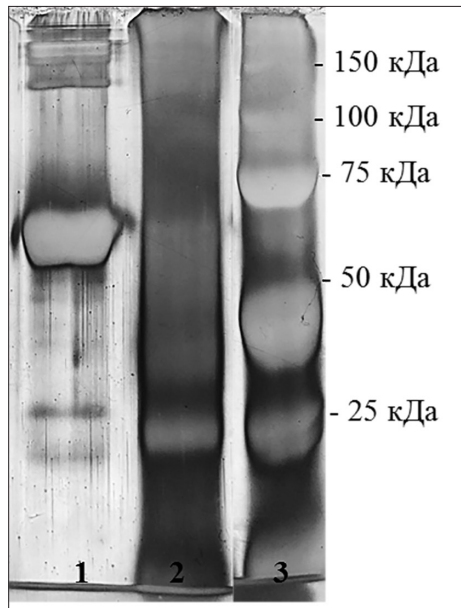


Рис. 2. Результаты электрофоретического разделения антигенов вируса Западного Нила (окрашивание серебром): 1 — коммерческий образец антигена ВЗН; 2 — антиген «CH1EN-1»; 3 — маркер Precision Plus Protein™ Unstained Standards Strep-tagged recombinant («Bio-Rad Laboratories, inc.», США)

В составе антигенного препарата вируса Западного Нила штамма CH1EN-1 удалось выявить и идентифицировать белки с мол.м.: $251 \pm 25,1$ кДа, 60 ± 6 кДа, $56 \pm 5,6$ кДа, $54 \pm 5,4$ кДа, $50,1 \pm 5,01$ кДа, $34 \pm 3,4$ кДа, $25,1 \pm 2,51$ кДа. Коммерческий образец содержит пять компонентов с молекулярными массами: $251 \pm 25,1$ кДа, $229 \pm 22,9$ кДа, $199 \pm 19,9$ кДа, $158 \pm 15,8$ и 60 ± 6 кДа (погрешность вычисления молекулярных масс указана в соответствии с инструкцией к набору соответствующих маркеров).

Из полученных данных следует, что, в отличие от контрольного образца, представленного преимущественно высокомолекулярными белками (158–210 кДа), в составе антигенного комплекса ВЗН CH1EN-1 преобладали низкомолекулярные компоненты (25–51 кДа); однако фракции с мол.м. 251 кДа и 60 кДа присутствуют в обоих пробах. С нашей точки зрения, этот факт позволяет подтвердить идентичность белковых компонентов в изучаемых образцах антигенных препаратов.

Заключение

Таким образом, нами получены моноклональные антитела к вирусу Западного Нила и охарактеризованы их иммунохимические свойства. Однако требуются дальнейшие исследования, которые позволят установить

эпитопную направленность полученных препаратов МКА, а также сделать вывод о возможности их использования в качестве компонентов диагностических наборов и тест-систем.

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

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

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

Литература

1. Азарян А.Р., Гришанова А.П., Иващенко Е.И., Шендо Г.Л. Серомониторинг циркуляции вируса Западного Нила на территории Астраханской области с 1997 по 2017 гг. // Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения: Сборник материалов научно-практической конференции ученых и специалистов Роспотребнадзора, Астрахань, 17 мая 2018 года. — Астрахань: Астраханский государственный медицинский университет, 2018. — С. 5–12.
2. Козлова А.А., Бутенко А.М., Ларичев В.Ф., Азарян А.Р., Гришанова А.П., Иващенко Е.И. и др. Изучение ареала вируса Западного Нила на территории европейской части России: результаты сероэпидемиологических исследований. Сообщение 1: Астраханская область, Краснодарский край, Ставропольский край, Саратовская область // Эпидемиол. и инфекц. бол. — 2016. — С. 244–252.
3. Львов Д.К., Писарев В.Б., Петров В.А., Григорьева Н.В. Лихорадка Западного Нила по материалам вспышек в Волгоградской области в 1999–2002 гг. — Волгоград, 2004. — 102 с.
4. Путинцева Е.В., Удовиченко С.К., Никитин Д.Н., Бородай Н.В., Шпак И.М., Фомина В.К., Несговорова А.В., Батулин А.А., Молчанова Е.В., Прилепская Д.Р., Пименова Е.В., Викторов Д.В., Топорков А.В. Лихорадка Западного Нила: результаты мониторинга за возбудителем в 2021 г. в Российской Федерации, прогноз заболеваемости на 2022 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2022. — № 1. — С. 43–53.
5. Штамм гибридных клеток животного *Mus musculus* l. 5H6 — продуцент моноклональных антител для выявления гликопротеина Е вируса Западного Нила, моноклональные антитела 5H6, продуцируемые указанным штаммом гибридных клеток, и иммуноферментный набор для выявления гликопротеина Е вируса Западного Нила с

- использованием указанных моноклональных антител: пат. 2 265 658 Рос. Федерация: 21.04.2015.
- Штамм гибридных клеток животного *Mus musculus* l. 9E2, используемый для получения моноклональных антител к белку Е вируса Западного Нила штамм WNV/LEIV-VIG99-27889: пат. 2 265 658 Рос. Федерация: 09.01.2004.
 - Яковлев А.Т., Зыкин Л.Ф., Рыбкин В.С. Иммуноферментный анализ в микробиологии / Под ред. Тихонова. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1990. – 108 с.
 - Goding J.W. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. – Academic Press Inc.: London, 1986. – 315 p.
 - Hornbeck P. Double-immunodiffusion assay for detecting specific antibodies (ouchterlony) // Curr. Protoc. Immunol. – 2017. – Vol. 116. – Art. 2.3.1–2.3.4. doi: 10.1002/cpim.18.
 - Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
 - Lustig Y., Sofer D., Bucris E.D., Mendelson E. Surveillance and diagnosis of West Nile virus in the face of flavivirus cross-reactivity // Front Microbiol. – 2018. – Vol. 9. – Art. 2421. doi: 10.3389/fmicb.2018.02421.
 - Lvov D.K., Butenko A.M., Gromashevsky V.L., Larichev V.P., Gaidamovich S.Y., Vyshemirsky O.I., Zhukov A.N., Lazorenko V.V., Salko V.N., Kovtunov A.I., Galimzyanov K.M., Platonov A.E., Morozova T.N., Khutoretskaya N.V., Shishkina E.O., Skvortsova T.M. Isolation of two strains of West Nile virus during an outbreak in southern Russia, 1999 // Emerg. Infect. Dis. – 2000. – Vol. 6. – P. 373–376.
 - Lipman N.S., Jackson L.R., Trudel L.J. and Weis-Garcia F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources // ILAR. J. – 2005. – Vol. 46. – No. 3. – P. 258–268.
 - Rossi S.L., Ross T.M., Evans J.D. West Nile virus // Clin. Lab. Med. – 2010. – Vol. 30. – No. 1. – P. 47–65.
 - Saxena D., Kumar J.S., Parida M., Sivakumar R.R., Patro I.K. Development and evaluation of NS1 specific monoclonal antibody based antigen capture ELISA and its implications in clinical diagnosis of West Nile virus infection // J. Clin. Virol. – 2013. – Vol. 58. – No. 3. – P. 528–534.
 - Kozlova AA, Butenko AM, Larichev VF, Azaryan AR, Grishanova AP, Ivashchenko YeI i dr. Izucheniye areala virusa Zapadnogo Nila na territorii yevropeyskoy chasti Ros-sii: rezul'taty seroepidemiologicheskikh issledovaniy. Soobshcheniye 1: Astrakhanskaya oblast', Krasnodarskiy kray, Stavropol'skiy kray, Saratovskaya oblast'. Epidemiol i infekts bol 2016; 244–252 (in Russian).
 - L'vov DK, Pisarev VB, Petrov VA, Grigor'yeva NV. Likhoradka Zapadnogo Nila po materialam vspyshek v Volgogradskoy oblasti v 1999–2002 gg. Volgograd, 2004: 102 (in Russian).
 - Putintseva YeV, Udovichenko SK, Nikitin DN, Boroday NV, Shpak IM, Fomina VK, Nesgovorova AV, Baturin AA, Molchanova YeV, Prilepskaya DR, Pimenova YeV, Viktorov DV, Toporkov AV. Likhoradka Zapadnogo Nila: rezul'taty monitoringa za vzbuditelem v 2021 g. v Rossiyskoy Federatsii, prognoz zabolevayemosti na 2022 g. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2022; 1:43–53 (in Russian).
 - Shtamm gibridnykh kletok zhivotnogo *Mus musculus* l. 5N6 – produtsent monoklonal'nykh antitel dlya vyyavleniya glikoproteina Ye virusa Zapadnogo Nila, monoklonal'nyye antitela 5N6, produtsiruyemye ukazannym shtammom gibridnykh kletok, i immunofermentnyy nabor dlya vyyavleniya glikoproteina Ye virusa Zapadnogo Nila s ispol'zovaniyem ukazannykh monoklonal'nykh antitel: pat. 2 265 658 Ros Federatsiya: 21.04.2015.
 - Shtamm gibridnykh kletok zhivotnogo *Mus musculus* l. 9E2, ispol'zuyemyy dlya polucheniya monoklonal'nykh antitel k belku Ye virusa Zapadnogo Nila shtamm WNV/LEIV-VIG99-27889: pat. 2 265 658 Ros Federatsiya: 09.01.2004.
 - Yakovlev AT, Zykin LF, Rybkin VS. Immunofermentnyy analiz v mикробиологии. Pod red. Tikhonova. Saratov: Izd-vo Sarat un-ta, 1990: 108 (in Russian).
 - Goding JW. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press Inc: London, 1986: 315.
 - Hornbeck P. Double-immunodiffusion assay for detecting specific antibodies (ouchterlony). Curr Protoc Immunol 2017; 116:2.3.1–2.3.4. doi: 10.1002/cpim.18.
 - Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227:680–685.
 - Lustig Y, Sofer D, Bucris ED, Mendelson E. Surveillance and diagnosis of West Nile virus in the face of flavivirus cross-reactivity. Front Microbiol 2018; 9:2421. doi: 10.3389/fmicb.2018.02421.
 - Lvov DK, Butenko AM, Gromashevsky VL, Larichev VP, Gaidamovich SY, Vyshemirsky OI, Zhukov AN, Lazorenko VV, Salko VN, Kovtunov AI, Galimzyanov KM, Platonov AE, Morozova TN, Khutoretskaya NV, Shishkina EO, Skvortsova TM. Isolation of two strains of West Nile virus during an outbreak in southern Russia, 1999. Emerg Infect Dis 2000; 6:373–376.

References

- Azaryan AR, Grishanova AP, Ivashchenko YeI, Shendo GL. Seromonitoring tsirkulyatsii virusa Zapadnogo Nila na territorii Astrakhanskoy oblasti s 1997 po 2017 gg. Aktual'nyye voprosy obespecheniya sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya: Sbornik materialov nauchno-prakticheskoy konferentsii uchenykh i spetsialistov Rospotrebnadzora, Astrakhan', 17 maya 2018 goda. Astrakhan': Astrakhanskiy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet, 2018: 5–12 (in Russian).

13. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ and Weis-Garcia F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J* 2005; 46(3):258–268.
14. Rossi SL, Ross TM, Evans JD. West Nile virus. *Clin Lab Med* 2010; 30(1):47–65.
15. Saxena D, Kumar JS, Parida M, Sivakumar RR, Patro IK. Development and evaluation of NS1 specific monoclonal antibody based antigen capture ELISA and its implications in clinical diagnosis of West Nile virus infection. *J Clin Virol* 2013; 58(3):528–534.

IMMUNOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO WEST NILE VIRUS

A.V. ELKHOVA, E.V. PIMENOVA, A.U. MACHNEVA,
T.V. ZAMARINA, A.T. YAKOVLEV, I.V. NOVITSKAYA

Volgograd Plague Control Research Institute of Rosпотребнадзор, Volgograd

Monoclonal antibodies (Mabs) against West Nile virus (WNV) antigen was obtained. Mabs antibodies have to be subjected to immunochemical characterization in immunodiffusion assay, ELISA for detection its specificity. WNV antigen was analyzed in SDS-PAAG electrophoresis. The results of the immunochemical characterization of monoclonal antibodies indicate their specific binding to WNV antigens. However, further study of antibodies is required to determine their epitope targeting and the possibility of use for the construction of diagnostic test systems.

Keywords: monoclonal antibody, West Nile virus.

Address:

Elkhova A.V.

Researcher at the laboratory of immunology
of the Volgograd Plague Control Research Institute
of the Rosпотребнадзор, Volgograd
E-mail: n.u.s.h.k.a@mail.ru

Для цитирования:

Елхова А.В., Пименова Е.В., Мачнева А.Ю., Замарина Т.В., Яковлев А.Т., Новицкая И.В. Иммунохимическая характеристика моноклональных антител к вирусу Западного Нила. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2023; 19(4):43–48.

For citation:

Elkhova A.V., Pimenova E.V., Novitskaya I.V., Machneva A.U., Zamarina T.V., Yakovlev A.T. Immunochemical characterization of monoclonal antibodies to West Nile virus. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2023; 19(4):43–48 (in Russian).

АНАЛИЗ КАЧЕСТВА ВАКЦИНЫ ХОЛЕРНОЙ БИВАЛЕНТНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ, ВЫПУЩЕННОЙ С 2013 ПО 2023 ГОДЫ

О.А. ЛОБОВИКОВА¹, И.В. ШУЛЬГИНА¹, О.А. ВОЛОХ^{1,2}, А.А. САВЕНКОВА^{1*},
О.В. ГРОМОВА¹, С.А. ВОРОБЬЕВА¹, А.С. ФЕСЬКОВА¹, Л.В. ЗАЙЦЕВА¹,
С.С. ГАЛЕТОВА¹, А.К. НИКИФОРОВ^{1,2}

¹ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора,

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

Применение оральных холерных вакцин рекомендовано ВОЗ в качестве одной из мер предотвращения эпидемий холеры. В России вакцинация против холеры включена в Календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» является производителем единственного зарегистрированного в России препарата для профилактики холеры — «Вакцины холерной бивалентной химической». Ретроспективный анализ показателей качества лекарственного препарата «Вакцина холерная бивалентная химическая», выпущенного с 2013 по 2023 гг., свидетельствует о стабильности технологического процесса и соответствии продукции требованиям нормативной документации по результатам контроля производителя и испытательных лабораторий.

Ключевые слова: вакцина холерная, показатели качества, контрольные карты Шухарта, коэффициент корреляции.

Введение

С середины 2021 года в мире отмечается тенденция к ухудшению эпидемиологической ситуации по холере, которая заключается в резком увеличении числа заболеваний и расширении географической распространенности, в том числе появлении на территориях, которые были свободны от холеры в течение десятилетий. В 2022 г. количество полученных ВОЗ уведомлений о случаях заболевания выросло более чем вдвое по сравнению с 2021 г. Заболевшие были зарегистрированы в 44 странах, что на 25% больше числа стран, сообщивших о случаях холеры в 2021 г. Вызывает озабоченность резкий рост показателей смертности, которая выросла более чем на 1% и достигла в среднем 1,9%, а в странах Африки — 2,9% [11]. По мнению экспертов ВОЗ, происходящее представляет собой новую волну продолжающейся седьмой

пандемии холеры, начавшейся в 1961 году [10]. Особая опасность дальнейшей активизации холеры существует в странах с низким уровнем экономического развития, а также при возникновении природных катаклизмов и гуманитарных кризисов.

В России в настоящее время эпидемиологическая обстановка по холере остается стабильной, риски связаны с завозом инфекции из эндемичных стран. Повышению уровня потенциальных рисков способствует ЧС социального характера (нарушение систем водоснабжения, водоотведения, медицинского обеспечения и др.); не исключена возможность биотерроризма [1].

В качестве одной из мер предотвращения эпидемий ВОЗ рекомендовано применение оральных холерных вакцин для контингента с повышенным риском заражения, а также и при выезде в неблагополучные по холере страны [12]. В России вакцинация против холеры включена в Календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям [2].

В нашей стране единственным производителем вакцины холерной является Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб».

Важнейшим аспектом требований GMP (Good Manufacturing Practice, Надлежащая производственная практика) является проведение контроля качества продукции для подтверждения соответствия лекарственного

© 2023 г. Лобовикова О.А., Шульгина И.В., Волох О.А., Савенкова А.А., Громова О.В., Воробьева С.А., Феськова А.С., Зайцева Л.В., Галетова С.С., Никифоров А.К.

* **Автор для переписки:**

Савенкова Анастасия Александровна
младший научный сотрудник отдела стандартизации, качества и метрологии ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
E-mail: savencova.vita@gmail.com

препарата документам регистрационного досье, что гарантирует безопасность и эффективность для пациентов [3]. Производитель обязан периодически проводить анализ результатов испытаний качества продукции с целью подтверждения постоянства технологического процесса, выявления тенденций качества и установления возможностей усовершенствования продукции и процесса.

Цель настоящей работы — ретроспективный анализ показателей качества серий иммунобиологического лекарственного препарата (ИЛП) «Вакцина холерная бивалентная химическая», выпущенных с 2013 по 2023 гг.

Материалы и методы

В ходе исследования были проанализированы результаты испытаний 25 серий холерной вакцины, полученные при выпускающем контроле качества в организации-изготовителе и при подтверждении соответствия в испытательных лабораториях (ИЛ), по показателям, включенным в спецификацию НД Р N 001465/01.

Количественные показатели качества оценивали с использованием карт индивидуальных значений Шухарта (X-карт), в соответствии с ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015 [5].

Статистическую обработку результатов выполняли с применением Microsoft Excel 2010. Корреляционную связь между результатами выпускающего контроля производителя и испытаниями ИЛ анализировали с помощью вычисления коэффициента корреляции Пирсона [9]. Для оценки значимости корреляции применяли шкалу Чеддока: слабая — от 0,1 до 0,3; умеренная — от 0,3 до 0,5; заметная — от 0,5 до 0,7; высокая — от 0,7 до 0,9; весьма высокая (сильная) — от 0,9 до 1,0 [8].

Результаты и обсуждение

Производство иммунобиологических лекарственных препаратов имеет свою специфику, определяемую характером продукции и технологией производства. В отличие от лекарственных средств, производимых с использованием стандартных химических и физических методов и сырья, производство ИЛП включает в себя использование биологических процессов и материалов, которые могут демонстрировать свойственную им изменчивость, нести существенные риски контаминации и образования побочных продуктов различной природы.

Контроль качества, как правило, предусматривает использование биологических аналитических методов, которые также характеризуются более высокой степенью

вариабельности, чем физико-химические методы. Поэтому при производстве ИЛП ключевая роль отводится надежному производственному процессу и контролю качества.

Для минимизации вариабельности и снижения рисков необходимы постоянные сбор и анализ информации о производственном процессе и контроле качества, в том числе, с применением статистических инструментов. Одним из них являются контрольные карты, представляющие собой графическое изображение информации, основанной на анализе результатов контроля качества. Метод контрольных карт позволяет оценить управляемость, стабильность и предсказуемость производственного процесса, проанализировать общие тенденции качества.

В ходе исследования был проведен ретроспективный анализ показателей качества коммерческих серий ИЛП «Вакцина холерная бивалентная химическая», выпущенных с 2013 по 2023 гг., с использованием методов медицинской статистики [4, 6].

В спецификацию нормативной документации (НД) на холерную вакцину включен выпускающий контроль качества по следующим показателям: описание; подлинность (антигенная активность по анатоксиносвязыванию, содержание О-антигена); распадаемость; средняя масса таблетки; формальдегид; рН; потеря в массе при высушивании; микробиологическая чистота; аномальная токсичность; специфическая безопасность; специфическая активность (антигенная активность по анатоксиносвязыванию, содержание О-антигена, иммуногенность в отношении заражающих штаммов различной серовароприморфности — *V. cholerae* O1 М-879 (Инаба) и Р-3122 (Огава).

Анализ данных контроля качества вышеуказанных серий вакцины холерной, проведенных производителем и в ИЛ, позволил установить соответствие выпускаемой продукции требованиям нормативной документации по всем показателям спецификации. Ниже представлены результаты анализа количественных показателей качества ИЛП «Вакцина холерная бивалентная химическая»: распадаемость, формальдегид, рН, микробиологическая чистота, специфическая активность (табл. 1).

«Распадаемость» представляет собой тест, предназначенный для контроля качества кишечнорастворимой оболочки таблетки, которая должна обеспечивать устойчивость таблетки в кислой среде желудка и высвобождение действующих веществ в кишечнике. В качестве оболочки при производстве вакцины используется целлацефат (ацетилфталилцеллюлоза) в количестве $8,55 \pm 0,05$ мг на таблетку, общий вес которой составляет 300 ± 15 мг.

Оценка качества ИЛП «Вакцина холерная бивалентная химическая»

№ п/п	Показатель качества	Требование НД	Результаты					
			производителя			ИЛ		
			min	max	$\bar{x} \pm m$	min	max	$\bar{x} \pm m$
1.	Распадаемость	устойчива к действию децимолярного раствора соляной кислоты в течение 3 ч и	устойчива в течение 3 ч	устойчива в течение 3 ч	устойчива в течение 3 ч	устойчива в течение 3 ч	устойчива в течение 3 ч	устойчива в течение 3 ч
		распадается в децимолярном растворе натрия гидроксида в течение 1 ч при температуре 37 ± 1 °С	распадается за 12 мин	распадается за 52 мин	распадается за $31,6 \pm 5,6$ мин	распадается за 20 мин	распадается за 50 мин	распадается за $34,1 \pm 6,7$ мин
2.	Формальдегид, %	не более 0,2%	0,01	0,08	$0,04 \pm 0,01$	0,03	0,18	$0,08 \pm 0,02$
3.	pH, ед. pH	от 6,7 до 7,4	6,7	7,2	$6,80 \pm 0,06$	6,7	7	$6,78 \pm 0,04$
5.	Микробиологическая чистота (на 1 таблетку)	не более 10^3 КОЕ аэробных микроорганизмов	2 КОЕ	678 КОЕ	$83,28 \pm 22,37$ КОЕ	0 КОЕ	508 КОЕ	$31,05 \pm 17,96$ КОЕ
		не более 10^2 КОЕ дрожжевых и плесневых грибов	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют
		отсутствие <i>Escherichia coli</i>	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют	отсутствуют
6.	Специфическая активность:							
	Антигенная активность по анатоксико-связыванию	100000 ± 20000 ЕС*	80000	120000	92400 ± 6224	80000	120000	96818 ± 6328
	Содержание О-антигена	не менее 2000 ус. ед. ** О-антигена <i>Vibrio cholerae</i> O1	2560	54040	14048 ± 5786	2600	46421	13721 ± 5156
	Иммуногенность (сер. Огава)	$E_{D_{50}}$ не более 1/20000 части таблетки	1/279576	1/51226	$1/96552 \pm 1/468160$	1/186960	1/37389	$1/93452 \pm 1/468078$
	Иммуногенность (сер. Инаба)	$E_{D_{50}}$ не более 1/20000 части таблетки	1/279576	1/35300	$1/99172 \pm 1/347926$	1/1522888	1/20446	$1/79475 \pm 1/234746$

Примечание: * — единицы связывания; ** — условные единицы

Для контроля гастрорезистентности оболочки используют 0,1 М раствор соляной кислоты, время устойчивости таблеток в кислой среде должно быть не менее 3 ч, таблетки не должны распадаться и обнаруживать признаки растрескивания и размягчения. На втором этапе кислоту заменяют децимолярным раствором натрия гидроксида, в течение 1 ч таблетки должны распадаться до рыхлой массы, без сохранения оболочки.

Анализ показателя «Распадаемость» показал, что оболочки таблеток всех серий были устойчивы к воздействию кислоты в течение 3 ч, распадеемость в растворе щелочи составила от 12 до 52 мин, при среднем значении $31,6 \pm 5,6$ мин, по данным производителя, и $34,1 \pm 6,7$ мин — по результатам ИЛ. При анализе показателя с использованием карт Шухарта (индивидуальных значений) было установлено, что процесс находится в состоянии статистической управляемости в отношении внутренней изменчивости, рассеяние значений показателя в пределах границ нормативных требований (рис. 1). При этом наблюдается незначительное смещение значений \bar{X} в сторону верхней границы допуска, выход расчетных значений показателя качества за пределы верхней гра-

ницы и вероятность брака составляет 0,82%. Следует отметить устойчивый тренд смещения средних значений показателя в сторону снижения, особенно отчетливо наблюдаемый в последние 2 года (серии №№ 20–25), что исключает возможные выбросы показателя за верхние пределы норматива. При дальнейшей реализации тренда в сторону снижения существуют риски выхода показателя за пределы нормы, что может быть обусловлено, по всей вероятности, уменьшением слоя оболочки и требует пристального внимания на технологическом этапе покрытия тел таблеток оболочкой.

Следующий показатель качества «Формальдегид» относится к тестам контроля остатков технологических примесей, так как формалин используется на стадиях производства холерной вакцины для инактивации бульонной культуры штаммов-продуцентов и детоксикации одного из антигенных компонентов вакцины — холерного токсина. Формальдегид определяют колориметрическим методом в реакции взаимодействия с фуксинсернистым реактивом, который основан на образовании хиноидного красителя — малинового окрашивания при реакции реактива с водорастворимыми альдегидами.



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

Содержание остаточного формальдегида выпущенных серий холерной вакцины, по данным производителя, находилось в диапазоне 0,01–0,08%, средние значения – 0,04±0,01% при норме не более 0,2%, что примерно в 5 раз ниже установленного предельного значения. Результаты этого теста свидетельствуют об эффективности процесса диализа, который используется на дальнейших этапах получения антигенных компонентов вакцины для очистки полуфабрикатов от прочих применяемых для фракционирования технологических примесей.

Контрольная карта индивидуальных значений для показателя «Формальдегид» (рис. 2) также подтвердила, что поле рассеяния значений показателя находится в пределах границы нормы, соответствие для данных объединенной выборки обеспечено; наблюдается тренд незначительного убывания значений X.

Отмечено существенное расхождение с результатами ИЛ, среднее значение составило 0,08±0,02%, при этом наибольшие отклонения с показаниями выявлены с 2020 года, когда результаты исследований в ИЛ в 2–3 раза выше полученных у производителя.

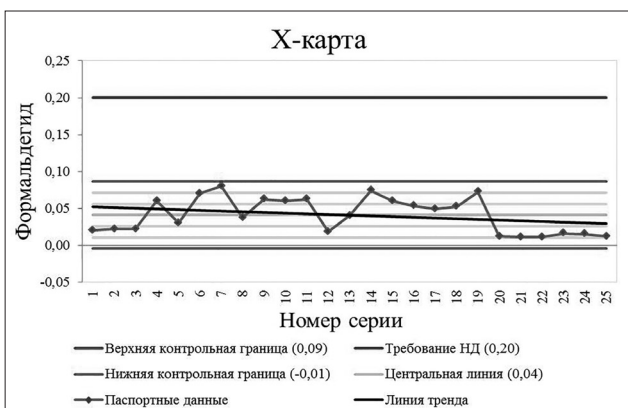


Рис. 2. X-карта индивидуальных значений для показателя «Формальдегид».

К физико-химическим тестам контроля готовой продукции относят определение рН и потери в массе при высушивании.

Определение рН проводят потенциометрическим методом в соответствии с ГФ РФ. Значение рН серий, выпущенных за последнее десятилетие, колебалось от 6,7 до 7,2, находясь в пределах нормативных границ 6,7–7,4; среднее значение составило 6,80±0,06 и 6,78±0,04, по данным производителя и ИЛ, соответственно. При построении контрольных карт индивидуальных значений рН для вакцины холерной (рис. 3) выявлена тенденция смещения индивидуальных значений во времени к нижней границе допуска; вызывает опасение достаточно высокая расчетная вероятная доля брака 22,07%. Настоящая технологическая схема производства не предусматривает корректировку рН компонентов таблетки. Возможно, необходимо ввести дополнительные контрольные точки, предусматривающие измерение рН растворов антигенных компонентов вакцины перед лиофилизацией. Альтернативой является введение контроля рН и, при необходимости, его корректировки на стадии формирования таблеточной смеси.



Рис. 3. X-карта индивидуальных значений для показателя «рН».

«Микробиологическая чистота» является одним из важнейших показателей качества фармацевтической продукции, так как присутствие микроорганизмов-контаминантов и продуктов их жизнедеятельности может представлять опасность для здоровья и жизни человека, а также оказывать деструктивное влияние на стабильность и эффективность лекарственных препаратов. Микробная загрязненность готового продукта служит критерием оценки гигиенического состояния оборудования и помещений, соблюдения правил гигиены персоналом и, в целом, характеризует уровень технологической культуры биологического производства.

В соответствии с НД в 1 таблетке холерной вакцины должно быть не более 1000 колониеобразующих единиц (КОЕ) аэробных микроорганизмов, не более 100 КОЕ — дрожжевых и плесневых грибов, должна отсутствовать *Escherichia coli*. В период с 2013 по 2023 годы «Микробиологическая чистота» подавляющего большинства серий (84%) не превышала 100 КОЕ на таблетку, за исключением четырех серий, выпущенных в 2016–2018 годах (№№ 5, 7, 8, 10), у которых микробная обсеменённость таблетки была существенно выше — от 173 до 678 КОЕ.

После выявления достаточно высокого уровня загрязнения был проведен комплекс мероприятий по сокращению микробной нагрузки: пересмотрены процедуры обработки помещений и оборудования, усилен микробиологический мониторинг производственной среды, введен дополнительный контроль полуфабрикатов активных компонентов на стадиях до и после лиофилизации, внесены соответствующие изменения в спецификации на них [7].

Благодаря реализации вышеуказанных превентивных мер удалось достичь минимального количества микроорганизмов-контаминантов в готовой лекарственной форме, что наглядно подтверждено при помощи контрольной карты индивидуальных значений (рис. 4).

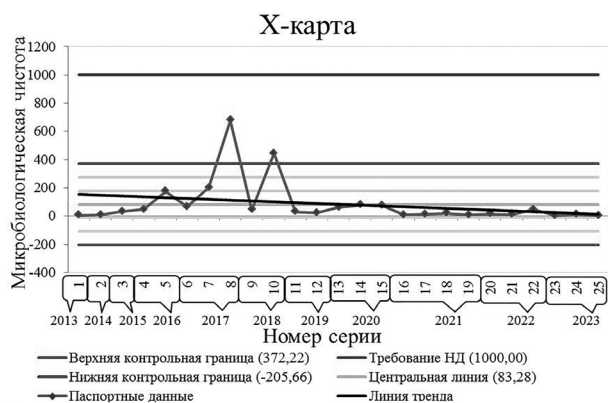


Рис. 4. X-карта индивидуальных значений для показателя «Микробиологическая чистота».

На завершающем этапе исследования были проанализированы данные по основному показателю качества вакцины «Специфическая активность», который является одним из факторов, определяющих уровень активного специфического иммунного ответа при введении человеку. Как правило, для определения специфической активности вакцин используются серологические, иммунохимические или биологические методы, позволяющие количественно оценить содержание активных компонентов, и тесты *in vivo*, основанные на определении степени

устойчивости вакцинированных лабораторных животных к специфическому инфекционному агенту.

В НД на холерную вакцину предусмотрено 2 метода исследования активности основных антигенных компонентов: реакция анатоксинсвязывания на кроликах, используемая для оценки содержания холероген-анатоксина, и реакция непрямой гемагглютинации для количественного определения О-антигенов. В качестве теста «активной защиты» используется тест «Иммунность» на белых беспородных мышях.

Исследование активности холероген-анатоксина проводят в тесте анатоксинсвязывания, в каждой пробе на кроликах. За 2013–2023 гг. значения показателя «Антигенная активность по анатоксинсвязыванию» соответствовали нормативным требованиям 80000 до 120000 ЕС, средние показатели у производителя и в ИЛ были сходными, близкими к медиане значений и составили 92400 ± 6224 ЕС и 96818 ± 6328 ЕС соответственно.

В соответствии с НД в таблетке должно быть не менее 2000 ус. ед. О-антигена штаммов *V. cholerae* O1. За период 2013–2023 гг. значения этого показателя у производителя колебались в пределе от 2560 до 54040 ус. ед. со средним значением 14048 ± 5786 ус. ед. В ИЛ получены сходные результаты $X = 13721 \pm 5156$. При построении контрольной карты индивидуальных значений (рис. 5) отмечены критерии нестабильности процесса, расчетная граница допуска находится несколько ниже нормативной, что указывает на небольшую вероятность брака (1,46%).

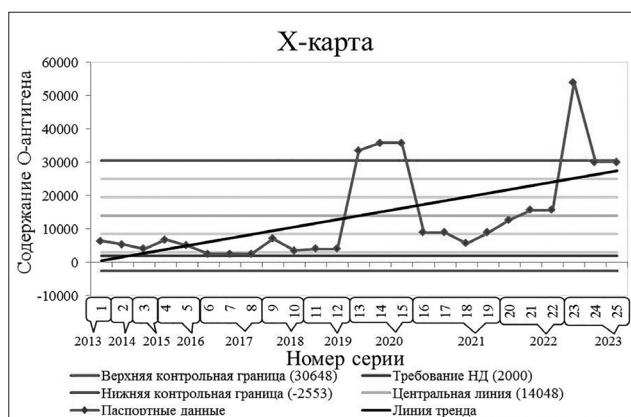


Рис. 5. X-карта индивидуальных значений для показателя «Содержание О-антигена»

При этом наблюдается устойчивый тренд возрастания значений X показателя качества «Специфическая активность: содержание О-антигена в таблетке». Следует отметить, что выпущенные в течение одного производственного года серии вакцины характеризуются близкими значениями показателя, что обусловлено, по-видимому, сопоставимой активностью

входящих в состав таблетки специфических антигенных фракций и определяется использованием одних партий сырья для культивирования штаммов-продуцентов и фракционирования антигенных компонентов вакцины.

Для оценки иммуногенных свойств серии холерной вакцины проводят исследование на беспородных белых мышах, с определением эффективной дозы ED₅₀, которая должна быть не более 1/20 000 части таблетки.

«Иммуногенность» в отношении штаммов серовара Огава в 2013–2023 гг. колебалась в интервале от 1/279576 до 1/51226 части таблетки со средним значением 1/96552±1/468160. Защитная активность вакцины в отношении штаммов серовара Инаба в 2013–2023 гг. находилась на сопоставимом уровне и составила в среднем 1/99172±1/347926 части таблетки. Анализ контрольных карт индивидуальных значений (рис. 6, 7) подтвердил,

что процесс является стабильным и статистически управляемым, качество соответствия для данных объединенной выборки обеспечено; верхние расчетные границы поля рассеяния в 2 раза ниже нормы: 1/41190 и 1/37810 часть таблетки для серовара Огава и Инаба, соответственно.

Сравнительный анализ результатов контроля качества у производителя и в ИЛ с вычислением коэффициента корреляции Пирсона и ранжированием по шкале Чеддока продемонстрировал весьма высокий уровень корреляции для показателей «Распадаемость», «Микробиологическая чистота», высокий уровень — для показателей «Антигенная активность по анатоксинам», «Иммуногенность (сер. Огава)» (табл. 2). Результаты испытаний по показателям «Формальдегид», «рН», «Содержание О-антигена», «Иммуногенность (сер. Инаба)» характеризовались заметной корреляцией.



Рис. 6. X-карта индивидуальных значений для показателя «Иммуногенность» в отношении штаммов *V. cholerae* O1 серовара Огава»

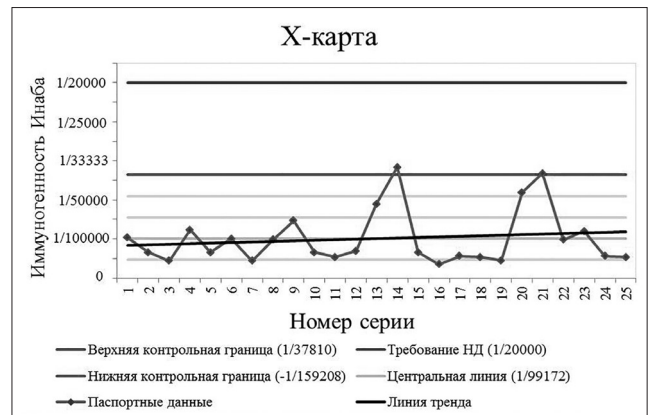


Рис. 7. X-карта индивидуальных значений для показателя «Иммуногенность» в отношении штаммов *V. cholerae* O1 серовара Инаба»

Таблица 2

Оценка корреляции результатов контроля качества

№ п/п	Показатель качества	Коэффициент корреляции	Сила корреляционной связи
1.	Распадаемость	0,84	Высокая
2.	Формальдегид	0,66	Заметная
3.	рН	0,62	Заметная
5.	Микробиологическая чистота	0,99	Весьма высокая
Специфическая активность:			
6.	антигенная активность по анатоксинам	0,84	Высокая
7.	содержание О-антигена	0,91	Весьма высокая
8.	иммуногенность (сер. Огава)	0,74	Высокая
9.	иммуногенность (сер. Инаба)	0,67	Заметная

Заключение

Выполненное исследование дает возможность прийти к таким выводам:

1. Ретроспективная оценка качества иммунобиологического лекарственного препарата «Вакцина холерная бивалентная химическая», выпущенного в период с 2013 по 2023 гг., подтвердила соответствие

всех серий требованиям нормативной документации по результатам контроля производителя и испытательных лабораторий.

2. Статистический анализ результатов контроля качества ИЛП «Вакцина холерная бивалентная химическая» с использованием карт Шухарта свидетельствует о стабильности и управляемости технологического процесса производства.

3. Установлена значительная корреляция результатов испытаний ИЛП «Вакцина холерная бивалентная химическая» при выпускающем контроле качества производителем и при подтверждении соответствия продукции в испытательных лабораториях.

Литература

1. Носков А.К., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А. [и др.]. Холера: анализ и оценка эпидемиологической обстановки в мире и России. Прогноз на 2023 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2023. — № 1. — С. 56–66.
2. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 6 декабря 2021 г. N 1122н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям и порядка проведения профилактических прививок».
3. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. N 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза».
4. Солонин С.И. Метод контрольных карт: Учебное пособие. — Екатеринбург, 2014. — 214 с.
5. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. контрольные карты Шухарта. ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. — 2015.
6. Статистические методы. Статистическое представление данных. Точечная оценка и доверительный интервал для среднего. ГОСТ Р 50779.22-2005 (ИСО 2602:1980). — 2005.
7. Ульянов А.Ю., Клокова О.Д., Громова О.В. [и др.]. Пути снижения контаминации на этапах производства холерной химической таблетированной вакцины // Проблемы особо опасных инфекций. — 2021. — № 1. — С. 152–155.
8. Чарыков А.К. Математическая обработка результатов химического анализа: Учеб. пособие для вузов. — Л.: Химия, 1984. — 168 с.
9. Электронный ресурс. — Режим доступа: <https://exceltable.com/funkcii-excel/koefficient-korrelyacii-pirsona/> (дата обращения 16.10.2023).
10. Электронный ресурс. — Режим доступа: <https://www.who.int/ru/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON437> (дата обращения 13.10.2023).
11. Электронный ресурс. — Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news/item/22-09-2023-new-analysis-confirms-world-seeing-an-upsurge-of-cholera> (дата обращения 13.10.2023).
12. World Health Organization. Cholera vaccine: WHO position paper, August 2017 — Recommendations / World Health Organization // Vaccine. — 2018. — Vol. 36. — No. 24. — P. 3418–3420.

References

1. Noskov AK, Kruglikov VD, Moskvitina EA [i dr.]. Kholera: analiz i otsenka epidemiologicheskoy obstanovki v mire i Rossii. Prognoz na 2023 g. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2023; 1:56–66 (in Russian).
2. Prikaz Ministerstva zdravookhraneniya RF ot 6 dekabrya 2021 g. N 1122n «Ob utverzhdenii natsional'nogo kalendarya profilakticheskikh privivok, kalendarya profilakticheskikh privivok po epidemicheskim pokazaniyam i poryadka provedeniya profilakticheskikh privivok» (in Russian).
3. Resheniye Soveta Yevraziyskoy ekonomicheskoy komissii ot 3 noyabrya 2016 g. N 77 «Ob utverzhdenii Pravil nadležashchey proizvodstvennoy praktiki Yevraziyskogo ekonomicheskogo soyuza» (in Russian).
4. Solonin SI. Metod kontrol'nykh kart: Uchebnoye posobiye. Yekaterinburg, 2014: 214 (in Russian).
5. Statisticheskiye metody. Kontrol'nyye karty. Chast' 2. kontrol'nyye karty Shukharta. GOST R ISO 7870-2-2015. 2015 (in Russian).
6. Statisticheskiye metody. Statisticheskoye predstavleniye dannykh. Tochechnaya otsenka i doveritel'nyy interval dlya srednego. GOST R 50779.22-2005 (ISO 2602:1980). — 2005 (in Russian).
7. Ul'yanov AYu, Klokova OD, Gromova OV [i dr.]. Puti snizheniya kontaminatsii na etapakh proizvodstva kholernoy khimicheskoy tabletirovannoy vaksiny. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2021; 1:152–155 (in Russian).
8. Charykov AK. Matematicheskaya obrabotka rezul'tatov khimicheskogo analiza: Ucheb. posobiye dlya vuzov. Leningrad: Khimiya, 1984: 168 (in Russian).
9. Elektronnyy resurs. URL: <https://exceltable.com/funkcii-excel/koefficient-korrelyacii-pirsona/> (data obrashcheniya 16.10.2023) (in Russian).
10. Elektronnyy resurs. URL: <https://www.who.int/ru/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON437> (data obrashcheniya 13.10.2023). (in Russian).
11. Elektronnyy resurs. URL: <https://www.who.int/ru/news/item/22-09-2023-new-analysis-confirms-world-seeing-an-upsurge-of-cholera> (data obrashcheniya 13.10.2023) (in Russian).
12. World Health Organization. Cholera vaccine: WHO position paper, August 2017 — Recommendations. World Health Organization. Vaccine 2018; 36(24):3418–3420.

QUALITY ANALYSIS OF *CHOLERA* BIVALENT CHEMICAL VACCINE, ISSUED FROM 2013 TO 2023

O.A. LOBOVIKOVA¹, I.V. SHULGINA¹, O.A. VOLOKH^{1,2}, A.A. SAVENKOVA¹, O.V. GROMOVA¹,
S.A. VOROBYOVA¹, A.S. FESKOVA¹, L.V. ZAITSEVA¹, S.S. GALETOVA¹, A.K. NIKIFOROV^{1,2}

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

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

The use of oral cholera vaccines is recommended by WHO as one of the measures to prevent cholera epidemics. In Russia, vaccination against cholera is included in the preventive vaccinations calendar for epidemic indications. The Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» is the manufacturer of the only one registered in Russia drug for the prevention of cholera – «Cholera bivalent chemical vaccine». A retrospective analysis of the quality indicators of the drug «Cholera bivalent chemical vaccine», produced from 2013 to 2023, testifies to the technological process stability and compliance of products with the requirements of regulatory documentation based on the results of the manufacturer's control and testing laboratories.

Keywords: cholera vaccine, quality indicators, Shuhart control cards, correlation coefficient.

Address:

Savenkova A.A.
Junior Researcher, Department of Standardization,
Quality and Metrology, FKUN Russian Anti-Plague
Institute «Microbe» Rospotrebnadzor
E-mail: savencova.vita@gmail.com

Для цитирования:

Лобовикова О.А., Шульгина И.В., Волох О.А., Савенкова А.А., Громова О.В., Воробьева С.А., Феськова А.С., Зайцева Л.В., Галетова С.С., Никифоров А.К. Анализ качества вакцины холерной бивалентной химической, выпущенной с 2013 по 2023 годы. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(4):49–56.

For citation:

Lobovikova O.A., Shulgina I.V., Volokh O.A., Savenkova A.A., Gromova O.V., Vorobyova S.A., Feskova A.S., Zaitseva L.V., Galetova S.S., Nikiforov A.K. Quality analysis of *Cholera* bivalent chemical vaccine, issued from 2013 to 2023. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(4): 49–56 (in Russian).

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭКЗОИНУЛИНАЗЫ ИЗ *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* С МОНО- И ПОЛИСАХАРИДАМИ

С.М. МАКИН¹, А.Н. ДУБОВИЦКАЯ¹, Д.Ю. БОГОМОЛОВ¹, М.С. КОНДРАТЬЕВ^{1,2},
М.Г. ХОЛЯВКА^{1,3*}, В.Г. АРТЮХОВ¹

¹ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж;

²Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Московская обл., Пушкино;

³ФГАОУ ВО Севастопольский государственный университет, Севастополь

Исследование пространственной структуры молекул ферментов способствует лучшему пониманию особенностей их функционирования и является основой для разработки новых препаратов для биотехнологической индустрии. В данной работе мы изучали изменения пространственной структуры молекулы экзоинулиназы из *Kluyveromyces marxianus* в процессе ее взаимодействия с моно- и полисахаридами. Проанализированы изменения в объеме и числе внутренних структур в процессе связывания инулиназы с моно- (глюкоза, фруктоза) и полисахаридными (инулин) соединениями. Описаны трансформации в числе и длине туннелей и пор, а также реорганизация состава и локализации групп заряженных и гидрофобных аминокислот на поверхности фермента. Установлено, что при взаимодействии с лигандами происходит реорганизация как внутренних структур фермента, так и состава аминокислотных скоплений на поверхности его молекулы. Выявленные в работе особенности взаимодействия экзоинулиназы с различными углеводами необходимо учитывать при разработке новых промышленных биокатализаторов на основе данного фермента.

Ключевые слова: инулиназа, катализ, полости, туннели, компьютерное моделирование.

Введение

Благодаря своей способности гидролизовать инулин фермент инулиназа (КФ 3.2.1.7) играет важную роль для пищевой промышленности в области производства фруктозы и фруктоолигосахаридов из экстрактов инулиносодержащих растений [8, 12].

Инулин состоит из линейных цепей молекул D-фруктофуранозы, соединенных β -2,1-гликозидными связями с фрагментом D-глюкозы на одном конце и фрагментом фруктозы на другом [8, 13].

Экзоинулиназы гидролизуют гликозидные связи инулина и инулоолигосахаридов с образованием фруктозы, которая является низкокалорийным подсластителем. Она в 2 раза слаще сахарозы, благодаря чему используется в качестве сахарозаменителя во многих пищевых продуктах; широко применяется в изготовлении напитков, для повышения индекса сладости конфет, шоколада, мороженого и т. д. [3, 6, 8]. Инулиназы применяются

также в производстве биотоплива (этанол, бутанол, ацетон), органических кислот (глутаминовой, молочной, янтарной и других кислот) [11].

Сырье, богатое инулином, представляет собой смесь сахаров [12] и может включать в себя, помимо инулина, другие углеводы [4]. Эти сахара способны оказывать различное влияние на инулиназную активность. В частности, фруктоза и глюкоза, являясь продуктами гидролиза инулина, оказывают на фермент ингибирующее воздействие [2, 9, 14]. Именно поэтому важно изучать механизмы взаимодействия представленных сахаров с энзимом с помощью методов молекулярного докинга и 3D-моделирования. Кроме того, анализ структуры молекул инулиназ помогает понять механизм их работы и роль конкретных аминокислотных остатков либо в связывании субстрата, либо в стабилизации трехмерной структуры белка. По этой причине исследования, детализирующие структурную организацию инулиназ, имеют высокий приоритет для фундаментальной и прикладной науки [5, 11].

Характерными структурными элементами молекулы белка являются туннели, внутренние полости и поры. Они непосредственно влияют на биологические функции и стабильность белковых макромолекул. Внутренние полости представляют собой пространство внутри молекулы белка, которое не заполнено аминокислотными остатками

© 2023 г. Макин С.М., Дубовицкая А.Н., Богомолов Д.Ю., Кондратьев М.С., Холявка М.Г., Артюхов В.Г.

* Автор для переписки:

Холявка Марина Геннадьевна

д.б.н., профессор кафедры биофизики и биотехнологии ВГУ

E-mail: holyavka@rambler.ru

и не связано с внешним растворителем. Термин «пора» описывает канал, проходящий через молекулу белка без прерываний внутренней полости и соединенный с внешней поверхностью молекулы. «Туннель» представляет собой канал, соединяющий поверхность белка с внутренней полостью или две или несколько внутренних полостей [7].

Туннели соединяют внутренние пространства биомолекул с внешним, позволяя субстратам перемещаться внутрь и выходить из каталитических центров ферментов, устанавливая субстратные каналы между двумя и более активными центрами. Следует отметить, что туннели были идентифицированы у 64% ферментов с известной кристаллической структурой, что свидетельствует о том, что они являются довольно характерными для белковых структур [10].

Туннели выполняют множество важных функций для ферментов: избирательно пропускают предпочтительный субстрат, задерживают прохождение нежелательных молекул, управляют движением кофакторов и растворителя. Порядок отдельных каталитических стадий ферментативного процесса также контролируется туннелями.

Молекулярные каналы являются ключевыми характеристиками огромного количества биомолекул. По этой причине целью работы было выявить особенности взаимодействий экзоинулиназы из *Kluveromyces marxianus* с инулином, фруктозой и глюкозой, учитывая параметры туннелей, полостей и пор, которые образуются в ходе этих взаимодействий, а именно — их объемы (нм^3) и протяженность (Å).

Материалы и методы

Объектом исследования выступила пространственная структура экзоинулиназы из *Kluveromyces marxianus* (PDB ID: 6J0T). Отрисовка молекул углеводов осуществлялась в программе HyperChem (Версия 8.0.10). В качестве углеводов были выбраны инулин (субстрат для инулиназы), фруктоза (основной про-

дукт реакции), глюкоза (побочный продукт реакции). Соотношение фруктоза:глюкоза в гидролизате инулина составляет порядка 27:1.

Докинг энзима с лигандами проводился в программном обеспечении AutoDock Vina (<https://sourceforge.net/projects/autodock-vina-1-1-2-64-bit/>). Вычисление параметров туннелей, внутренних полостей и пор осуществлялось при помощи программы MOLE (<http://mole.chemi.muni.cz/>). Анализ скоплений аминокислотных остатков на поверхности молекулы инулиназы проводился в программном обеспечении Maestro 10.3 (<https://www.schrodinger.com/products/maestro>). Расстояния (r) между аминокислотными остатками на поверхности ферментов были рассчитаны на основе координат атомов в их составе по формуле:

$$r = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2},$$

где x_1 и x_2 — координаты атомов двух аминокислот по оси абсцисс, y_1 и y_2 — координаты атомов аминокислот по оси ординат, z_1 и z_2 — координаты по оси аппликат. За скопление принимались аминокислотные остатки, расстояние между которыми не превышало 10 Å [1].

Результаты и обсуждение

На поверхности пространственной структуры молекулы экзоинулиназы, источником которой является *Kluveromyces marxianus*, найдено 6 скоплений заряженных и 8 скоплений гидрофобных аминокислотных остатков. Данные об изменении состава, количества и локализации скоплений заряженных аминокислотных остатков при одноточечном связывании с различными углеводами представлены в таблице 1 и на рисунке 1.

Как видно из таблицы 1, при взаимодействии экзоинулиназы с инулином исчезает скопление 5. Скопление 4 в малой степени изменяет свой состав при взаимодействии с глюкозой: из него исчезает аминокислотный остаток Lys359.

Таблица 1

Аминокислотный состав заряженных скоплений на поверхности молекулы инулиназы из *Kluveromyces marxianus*

Лиганды	Скопление 1	Скопление 2	Скопление 3	Скопление 4	Скопление 5	Скопление 6
без лигандов	Lys22, Arg23, Asp24, Asp26, Lys28, His467, Lys469, Lys474, Glu475, His481	Arg39, His48, Asp98, Lys505	Lys62, Glu64, Lys91, Arg135, Asp159	Glu189, Lys244, Asp259, Lys261, Asp263, Glu323, Lys324, Asp325, Lys359, Asp360	His229, Asp289, His294, Asp299, Asp300	Glu400, Lys403, Lys404, Lys406, Asp408, Lys429, Asp445, Asp446, Arg451, Lys537, Asp541, Lys542

комплекс с фруктозой	Lys22, Arg23, Asp24, Asp26, Lys28, His467, Lys469, Lys474, Glu475, His481	Arg39, His48, Asp98, Lys505	Lys62, Glu64, Lys91, Arg135, Asp159	Glu189, Lys244, Asp259, Lys261, Asp263, Glu323, Lys324, Asp325, Lys359, Asp360	His229, Asp289, His294, Asp299, Asp300	Glu400, Lys403, Lys404, Lys406, Asp408, Lys429, Asp445, Asp446, Arg451, Lys537, Asp541, Lys542
комплекс с глюкозой	Lys22, Arg23, Asp24, Asp26, Lys28, His467, Lys469, Lys474, Glu475, His481	Arg39, His48, Asp98, Lys505	Lys62, Glu64, Lys91, Arg135, Asp159	Glu189, Lys244, Asp259, Lys261, Asp263, Glu323, Lys324, Asp325, Asp360	His229, Asp289, His294, Asp299, Asp300	Glu400, Lys403, Lys404, Lys406, Asp408, Lys429, Asp445, Asp446, Arg451, Lys537, Asp541, Lys542
комплекс с инулином	Lys22, Arg23, Asp24, Asp26, Lys28, His467, Lys469, Lys474, Glu475, His481	Arg39, His48, Asp98, Lys505	Lys62, Glu64, Lys91, Arg135, Asp159	Glu189, Lys244, Asp259, Lys261, Asp263, Glu323, Lys324, Asp325, Asp360	-	Glu400, Lys403, Lys404, Lys406, Asp408, Lys429, Asp445, Asp446, Arg451, Lys537, Asp541, Lys542

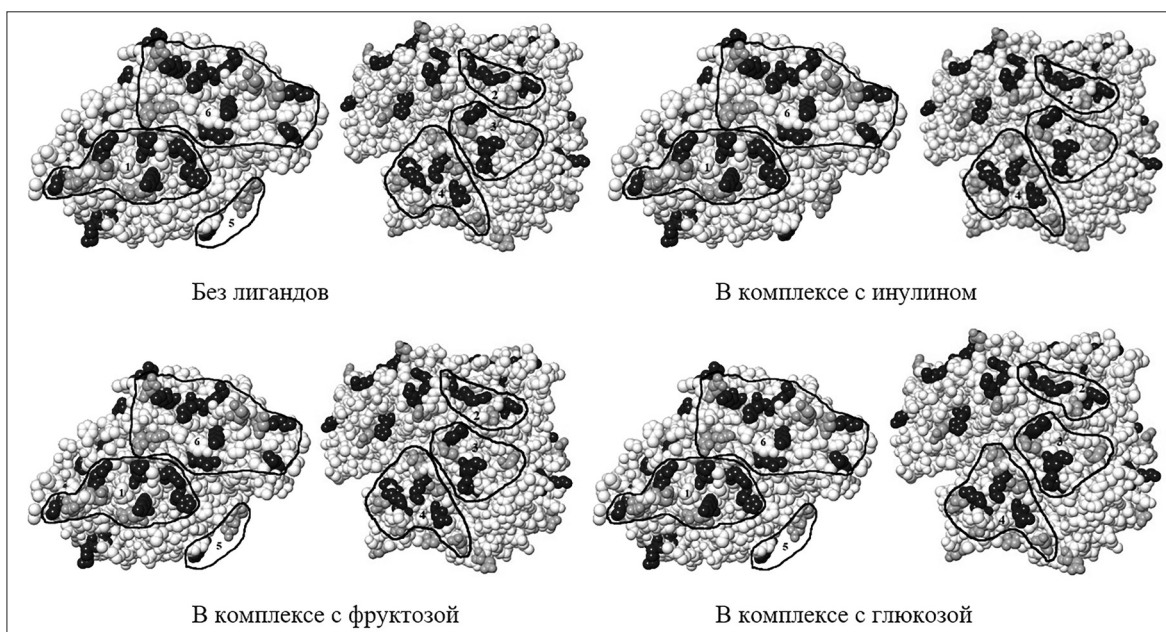


Рис. 1. Локализация скоплений заряженных аминокислотных остатков в составе моделей экзоинулиназы из *Kluyveromyces marxianus* при одноточечном связывании с углеводами

Для скоплений гидрофобных аминокислотных остатков различия в составе, локализации и количестве при одноточечном связывании с различными сахарами представлены в таблице 2 и на рисунке 2. При взаимодействии со всеми углеводами происходит исчезновение скопления 6, других изменений не наблюдается.

Был также проведен анализ изменений внутренних структур молекул фермента при образовании комплексов с сахарами (табл. 3, рис. 3). В моделях, полученных одноточечным докинггом, наблюдается присутствие внутренних полостей, бóльшая из которых имеет объем 0,502 нм³. В

случае докинга молекулы инулиназы с инулином третья внутренняя полость прилегает к лиганду, аналогичное явление замечено и в модели комплекса с фруктозой. Данные полости различны по размеру, но соответствуют друг другу пространственно; кроме того, их составляют практически аналогичные аминокислотные остатки:

С инулином: Tyr 247, Asp 248, Ser 249, Ser 255, Asn 256, Ser 257, Leu 358, Lys 359, Asp 360, Asp 369, Val 370.

С фруктозой: Tyr 247, Asp 248, Ser 255, Asn 256, Ser 257, Leu 358, Lys 359, Asp 360, Val 370.

Таблица 2

**Аминокислотный состав гидрофобных скоплений на поверхности молекулы инулиназы
из *Kluyveromyces marxianus***

Лиганды	Скопление 1	Скопление 2	Скопление 3	Скопление 4	Скопление 5	Скопление 6	Скопление 7	Скопление 8
без лигандов	Leu3, Ala4, Tyr5, Leu7, Leu8, Leu9, Leu11, Ala12, Val18, Ile19, Tyr21, Gly25, Ala29, Ile30, Phe35, Leu37, Ala75, Trp79, Pro345, Pro471	Ala61, Tyr121, Pro134, Pro321	Tyr99, Gly100, Ala101, Tyr162,	Gly147, Pro148, Ala171, Ile175, Val207	Trp232, Pro274, Pro277, Leu278, Phe304, Phe478, Ala484	Val250, Ala251, Ile298, Ala368	Pro376, Tyr380, Leu383, Gly387	Pro426, Ile428, Val432, Phe433, Gly458
комплекс с фруктозой	Leu3, Ala4, Tyr5, Leu7, Leu8, Leu9, Leu11, Ala12, Val18, Ile19, Tyr21, Gly25, Ala29, Ile30, Phe35, Leu37, Ala75, Trp79, Pro345, Pro471	Ala61, Tyr121, Pro134, Pro321	Tyr99, Gly100, Ala101, Tyr162,	Gly147, Pro148, Ala171, Ile175, Val207	Trp232, Pro274, Pro277, Leu278, Phe304, Phe478, Ala484	-	Pro376, Tyr380, Leu383, Gly387	Pro426, Ile428, Val432, Phe433, Gly458
комплекс с глюкозой	Leu3, Ala4, Tyr5, Leu7, Leu8, Leu9, Leu11, Ala12, Val18, Ile19, Tyr21, Gly25, Ala29, Ile30, Phe35, Leu37, Ala75, Trp79, Pro345, Pro471	Ala61, Tyr121, Pro134, Pro321	Tyr99, Gly100, Ala101, Tyr162,	Gly147, Pro148, Ala171, Ile175, Val207	Trp232, Pro274, Pro277, Leu278, Phe304, Phe478, Ala484	-	Pro376, Tyr380, Leu383, Gly387	Pro426, Ile428, Val432, Phe433, Gly458
комплекс с инулином	Leu3, Ala4, Tyr5, Leu7, Leu8, Leu9, Leu11, Ala12, Val18, Ile19, Tyr21, Gly25, Ala29, Ile30, Phe35, Leu37, Ala75, Trp79, Pro345, Pro471	Ala61, Tyr121, Pro134, Pro321	Tyr99, Gly100, Ala101, Tyr162,	Gly147, Pro148, Ala171, Ile175, Val207	Trp232, Pro274, Pro277, Leu278, Phe304, Phe478, Ala484	-	Pro376, Tyr380, Leu383, Gly387	Pro426, Ile428, Val432, Phe433, Gly458

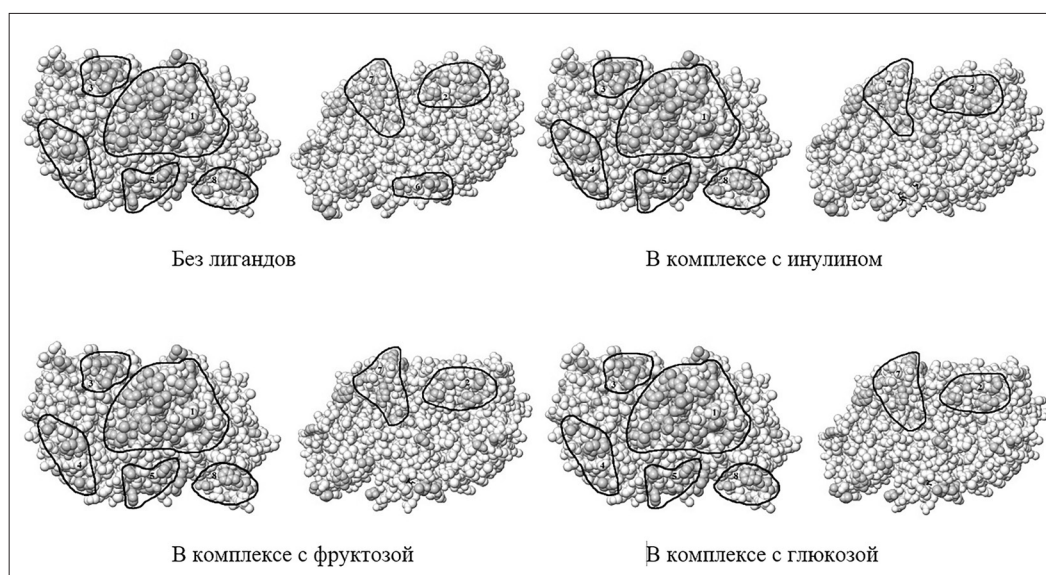


Рис. 2. Локализация скоплений гидрофобных аминокислотных остатков в составе моделей экзоинулиназы из *Kluyveromyces marxianus* при односточном связывании с углеводами

Таблица 3

Характеристики внутренних структур моделей инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* с различными углеводами, полученных путем односточного молекулярного докинга

№	Нативный фермент	Комплекс с фруктозой	Комплекс с глюкозой	Комплекс с инулином
Объем внутренних полостей, нм ³				
1	0,502	0,502	0,502	0,502
2	0,501	0,501	0,501	0,501
3	-	0,093	-	0,160
Длина туннелей, Å				
1	14,68	-	-	14,68
2	22,12	-	-	22,12
3	9,32	9,32	9,32	9,32
4	8,18	-	-	-
5	10,67	8,47	10,67	-
6	13,59	13,59	13,59	13,59
7	9,95	9,95	9,95	9,95
8	5,01	5,01	5,01	5,01
9	5,31	5,31	5,31	5,31
10	8,04	8,04	8,04	8,04
11	8,23	8,23	8,23	8,23
12	10,76	10,76	10,76	10,76
13	9,32	9,32	9,32	9,32
Поры				
1	26,78	26,78	26,78	26,78
2	12,03	-	9,51	-
3	24,02	-	-	-
4	9,68	9,68	9,68	9,68
5	14,71	14,71	14,71	14,71

В модели нативного фермента необходимо отметить значительную степень перекрытия пор и туннелей. Наблюдается перекрытие пор 2 и 3, 4 и 5. Кроме того, замечено перекрытие туннелей 4 и 5 с порами 2 и 3. Туннели 9, 10 и 11 перекрываются между собой и с обеими порами 4 и 5. Туннели 1 и 2 перекрываются с порой 1.

При образовании комплекса инулиназы с углеводами исчезает туннель 3. При взаимодействии инулиназы с глюкозой и фруктозой исчезают туннели 1 и 2. Туннель 5 претерпевает изменения: при взаимодействии с инулином данная структура исчезает, а при докинге с фруктозой сокращает свою длину с 10,67 до 8,47 Å.

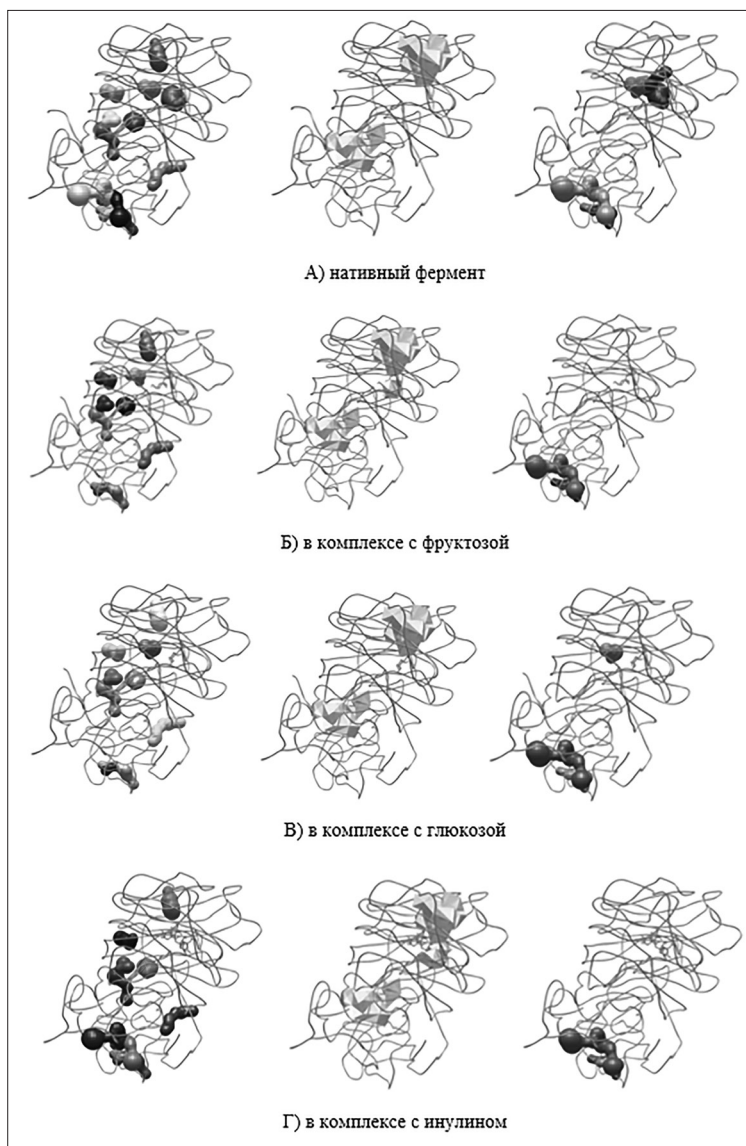


Рис. 3. Внутренние структуры инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*, нативной и в комплексе с различными лигандами (справа налево: туннели, внутренние полости, поры)

Модель комплекса инулиназа-фруктоза характеризуется появлением третьей внутренней полости объемом $0,093 \text{ нм}^3$. Поры 4 и 5 перекрываются между собой и с туннелями 9–11. Поры 2 и 3 отсутствуют. При взаимодействии инули-

назы с глюкозой пора 2 изменяет размер от таковой в модели нативного фермента (рис. 4), она также перекрывается с туннелем 5. Туннели 9, 10 и 11 перекрываются между собой и с обеими порами 4 и 5. Поры 2 и 3 отсутствуют.

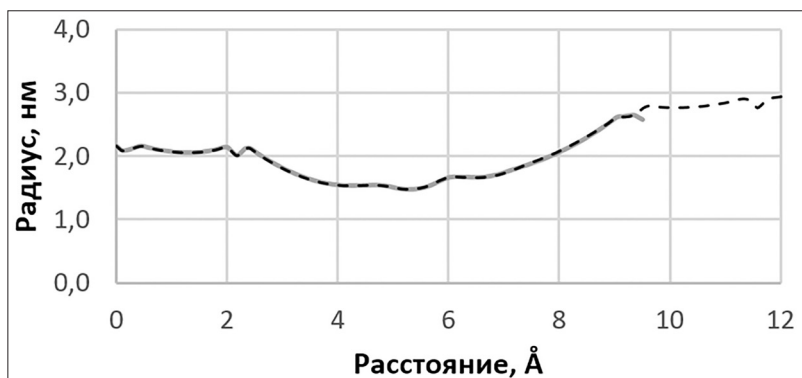


Рис. 4. Сравнение профилей поры 2 в модели нативного фермента и в комплексе с глюкозой

В модели фермента в комплексе с инулином туннели 1 и 2 перекрываются с порой 1. Туннели 9, 10 и 11 перекрываются между собой и с обеими порами 4 и 5. При этом туннели 4 и 5 исчезают.

Методами молекулярного докинга были определены типы взаимодействия полисахаридов с инулиназой (рис. 5). Связывание молекулы фермента с глюкозой также осуществлялось посредством нековалентных взаимодействий с аминокислотными остатками. В гидрофобных взаимодействиях принимали участие Tyr 247, Val 250, Asp 360, Val 370, в то время как аминокислотные остатки Ser 249, Ala 251, Ser 253, Ser 254, Ser 255, Lys359 были вовлечены в образование водородных связей с молекулой лиганда.

Установлено, что взаимодействие с фруктозой осуществлялось с помощью образования водородных связей со следующими аминокислотами: Ser 249, Ser 253, Ser 254, Ser 255, Ala 368. В гидрофобные взаимодействия

были вовлечены аминокислоты Tyr 247, Ala 251, Asp 360, Asp 369, Val 370. Выделенные жирным шрифтом аминокислотные остатки (Ser 255, Tyr 247, Asp 360, Val 370) входят в состав внутренней полости, прилегающей к лиганду.

Образование комплекса инулин-экзоинулиназа происходило аналогичным образом. Водородные связи образовывались с аминокислотными остатками Tyr 247, Ala 251, Ser 253, Ser 254, Ser 255, Asp 369. В гидрофобные взаимодействия внесли вклад аминокислоты Ser 249, Val 250, Asp 252, Ile 298, Asp 299, Asp 360, Ser 367, Ala 368, Val 370. Аминокислоты Tyr 247, Ser 249, Ser 255, Asp 360, Asp 369, Val 370 также входят в состав внутренней полости, непосредственно прилегающей к лиганду. Данное сравнение позволяет сделать вывод о важности внутренних структур, в частности, внутренних полостей, в межмолекулярном взаимодействии.

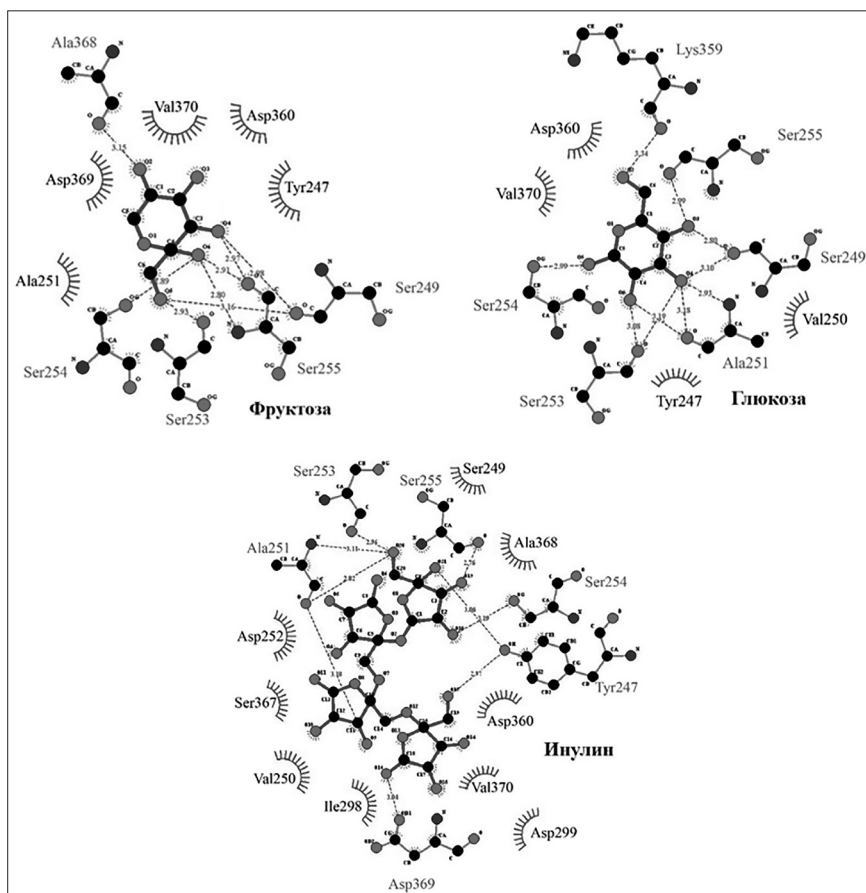


Рис. 5. Детализация взаимодействия моно- и полисахаридов с экзоинулиназой из *Kluyveromyces marxianus*

Заключение

В результате проведенных расчетов было выявлено, что модели комплексов молекулы инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* с инулином и фруктозой имеют общие тенденции в

изменении состава и формы внутренних структур. В частности, комплексы фермента с данными углеводами приобретают новую внутреннюю полость, которая предположительно играет роль во взаимодействии с названными лигандами. Кроме того, при взаимодействии с углеводами происходит изменение

состава гидрофобных скоплений на поверхности молекулы, что позволяет говорить о преимущественном вовлечении во взаимодействие гидрофобных структур фермента.

Производство инулина из инулинсодержащего сырья является неотъемлемой частью процесса создания низкокалорийных подсластителей. Это исследование позволяет более глубоко понять механизмы взаимодействия инулиназы с различными углеводами, что, в свою очередь, дает возможность использовать полученные результаты в пищевой промышленности.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023–2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

Литература

1. Богомолов Д.Ю., Сакибаев Ф.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Селеменев В.Ф. Изучение *in silico* структурных особенностей липаз из различных продуцентов как потенциальных агентов для иммобилизации на заряженных и гидрофобных носителях // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2021. — Т. 21. — № 4. — С. 555–567.
2. Corona R.I., Morales-Burgos A., Pelayo C., Arias J.A., García-Sandoval J.P. Substrates' and products' inhibition in fructanase production by a new *Kluyveromyces marxianus* CF15 from Agave tequilana fructan in a batch reactor // Bioprocess and biosystems engineering. — 2019. — Vol. 42. — No. 11. — P. 1779–1791.
3. Holyavka M.G., Kayumov A.R., Baydamshina D.R., Koroleva V.A., Trizna E.Yu., Trushin M.V., Artyukhov V.G. Efficient fructose production from plant extracts by immobilized inulinases from *Kluyveromyces marxianus* and *Helianthus tuberosus* // International journal of biological macromolecules. — 2018. — Vol. 115. — P. 829–834.
4. Holyavka M.G., Kondratyev M.S., Lukin A.N., Agapov B.L., Artyukhov V.G. Immobilization of inulinase on KU-2 ion-exchange resin matrix // International journal of biological macromolecules. — 2019. — Vol. 138. — P. 681–692.
5. Holyavka M.G., Kondratyev M.S., Samchenko A.A., Kabanov A.V., Komarov V.M., Artyukhov V.G. *In silico* design of high-affinity ligands for the immobilization of inulinase // Computers in biology and medicine. — 2016. — Vol. 71. — P. 198–204.
6. Holyavka M., Artyukhov V., Kovaleva T. Structural and functional properties of inulinases: a review // Biocatalysis and Biotransformation. — 2016. — Vol. 34(1). — P. 1–17.
7. Kokkonen P., Bednar D., Pinto G., Prokop Z., Damborsky J. Engineering enzyme access tunnels // Biotechnology advances. — 2019. — Vol. 37. — No. 6. — Art. 107386. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.04.008.
8. Mathur A., Sadana D. Inulinase: Microbial origin to food applications // World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. — 2021. — Vol. 10. — No. 4. — P. 360–374.
9. Meng Q., Lu C., Gao H., Chen G., Wu L., Wu J., Li S., He B.F. Efficient biosynthesis of exopolysaccharide from Jerusalem artichoke using a novel strain of *Bacillus velezensis* LT-2 // Bioresource Technology. — 2021. — Vol. 320. — Art. 124346. doi: 10.1016/j.biortech.2020.124346.
10. Pravda L., Sehnal D., Varekova R.S., Navatilova V., Tousek D., Berka K., Otyepka M., Koca J. ChannelsDB: database of biomacromolecular tunnels and pores // Nucleic Acids Research. — 2018. — Vol. 46(D1). — D399–D405. doi:10.1093/nar/gkx868.
11. Singh R.S., Singh T., Hassan M., Kennedy J.F. Updates on inulinases: Structural aspects and biotechnological applications // International Journal of Biological Macromolecules. — 2020. — Vol. 164. — P. 193–210.
12. Singh R.S., Singh T., Larroche C. Biotechnological applications of inulin-rich feedstocks // Bioresource technology. — 2019. — Vol. 273. — P. 641–653.
13. Stolzenburg K. Jerusalem artichokes-raw material for inulin and fructose production // Zuckerindustrie. — 2005. — Vol. 130. — No. 3. — P. 193–200.
14. Zhang L., Zhao C., Wang J., Ohta Y., Wang Y. Inhibition of glucose on an exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* expressed in *Pichia pastoris* // Process Biochemistry. — 2005. — Vol. 40. — No. 5. — P. 1541–1545.

References

1. Bogomolov DYu, Sakibayev FA, Kholyavka MG, Artyukhov VG, Selemenov VF. Izuchenye *in silico* strukturnykh osobennostey lipaz iz razlichnykh produtsentov kak potentsial'nykh agentov dlya immobilizatsii na zaryazhennykh i gidrofobnykh nositelyakh. Sorbtionnyye i khromatograficheskiye protsessy 2021; 21(4):555–56 (in Russian).
2. Corona RI, Morales-Burgos A, Pelayo C, Arias JA, García-Sandoval JP. Substrates' and products' inhibition in fructanase production by a new *Kluyveromyces marxianus* CF15 from Agave tequilana fructan in a batch reactor. Bioprocess and biosystems engineering 2019; 42(11):1779–1791.
3. Holyavka MG, Kayumov AR, Baydamshina DR, Koroleva VA, Trizna EYu, Trushin MV, Artyukhov VG. Efficient fructose production from plant extracts by immobilized inulinases from *Kluyveromyces marxianus* and *Helianthus tuberosus*. International journal of biological macromolecules 2018; 115:829–834.
4. Holyavka MG, Kondratyev MS, Lukin AN, Agapov BL, Artyukhov VG. Immobilization of inulinase on KU-2 ion-exchange resin matrix. International journal of biological macromolecules 2019; 138:681–692.
5. Holyavka MG, Kondratyev MS, Samchenko AA, Kabanov AV, Komarov VM, Artyukhov VG. *In silico* design of high-

- affinity ligands for the immobilization of inulinase. *Computers in biology and medicine* 2016; 71:198–204.
6. Holyavka M, Artyukhov V, Kovaleva T. Structural and functional properties of inulinases: a review. *Biocatalysis and Biotransformation* 2016; 34(1):1–17.
 7. Kokkonen P, Bednar D, Pinto G, Prokop Z, Damborsky J. Engineering enzyme access tunnels. *Biotechnology advances* 2019; 37(6):107386. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.04.008.
 8. Mathur A, Sadana D. Inulinase: Microbial origin to food applications. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2021; 10(4):360–374.
 9. Meng Q, Lu C, Gao H, Chen G, Wu L, Wu J, Li S, He BF. Efficient biosynthesis of exopolysaccharide from Jerusalem artichoke using a novel strain of *Bacillus velezensis* LT-2. *Bioresource Technology* 2021; 320:124346. doi: 10.1016/j.biortech.2020.124346.
 10. Pravda L, Sehnal D, Varekova RS, Navatilova V, Tousek D, Berka K, Otyepka M, Koca J. ChannelsDB: database of biomacromolecular tunnels and pores. *Nucleic Acids Research* 2018; 46(D1). – D399–D405. doi:10.1093/nar/gkx868.
 11. Singh RS, Singh T, Hassan M, Kennedy JF. Updates on inulinases: Structural aspects and biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 2020; 164:193–210.
 12. Singh RS, Singh T, Larroche C. Biotechnological applications of inulin-rich feedstocks. *Bioresource technology* 2019; 273:641–653.
 13. Stolzenburg K. Jerusalem artichokes-raw material for inulin and fructose production. *Zuckerindustrie* 2005; 130(3):193–200.
 14. Zhang L, Zhao C, Wang J, Ohta Y, Wang Y. Inhibition of glucose on an exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* expressed in *Pichia pastoris* // *Process Biochemistry* 2005; 40(5):1541–1545.

FEATURES OF THE INTERACTION OF EXOINULINASE FROM *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* WITH MONO- AND POLYSACCHARIDES

S.M. MAKIN¹, A.N. DUBOVITSKAYA¹, D.YU. BOGOMOLOV¹, M.S. KONDRATYEV^{1,2},
M.G. HOLYAVKA^{1,3}, V.G. ARTYUKHOV¹

¹ Voronezh State University, Voronezh;

² Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region;

³ Sevastopol State University, Sevastopol

This study of the spatial structures of enzyme molecules contributes to a better understanding of the features of their functioning and is the basis for the development of new drugs for the biotechnology industry. In this work, we studied changes in the spatial structures of the exoinulinase molecule from *Kluyveromyces marxianus* during its interaction with mono- and polysaccharides. Changes in the volume and number of internal structures during the interaction between inulinase and mono- (glucose, fructose) and polysaccharides (inulin) were analyzed. Transformations in the number and length of tunnels and pores, as well as reorganization of the composition and localization of charged and hydrophobic amino acids on the surface of the enzyme have been described. It has been established that interactions with ligands causes a reorganization of the internal structures of the enzyme and the composition of amino acid residues on its surface. The peculiarities of exoinulinase interaction with various carbohydrates described in this work can be helpful in developing new industrial biocatalysts based on this enzyme.

Keywords: inulinase, catalysis, cavities, tunnels, computer modeling.

Address:

Kholyavka M.G., Ph.D.

Professor of the department of biophysics and biotechnology of VSU

E-mail: holyavka@rambler.ru

Для цитирования:

Макин С.М., Дубовицкая А.Н., Богомолов Д.Ю., Кондратьев М.С., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. Особенности взаимодействия экзоинулиназы из *Kluyveromyces marxianus* с моно- и полисахаридами. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(4):57–65.

For citation:

Makin S.M., Dubovitskaya A.N., Bogomolov D.Yu., Kondratyev M.S., Holyavka M.G., Artyukhov V.G. Features of the interaction of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* with mono- and polysaccharides. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2023; 19(4):57–65 (in Russian).

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ И МЕТОДИЧЕСКИХ ПРИЕМОМ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ *YERSINIA PESTIS* (КАПСУЛЬНОЙ И БЕСКАПСУЛЬНОЙ ФОРМ)

А.А. СЕМИРЧЕВА*, И.С. ТЮМЕНЦЕВА, Е.Н. АФАНАСЬЕВ, Д.В. РУСАНОВА,
Ю.Ю. ГАРКУША, Е.В. ЖДАНОВА, И.В. ЖАРНИКОВА

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь

Авторами статьи описана разработка иммунодиагностических препаратов для детекции *Y. pestis* (капсульной и бескапсульной форм), которые позволяют обнаруживать типичные и измененные в антигенном отношении штаммы чумного микроба с положительным и/или отрицательным выражением «фракции 1». Также подтверждена эффективность использования чумного иммуномагнитного сорбента, обеспечивающего селективное концентрирование материала с низким содержанием патогена и очистку проб от возможной контаминации посторонней микрофлорой в лабораторных и полевых условиях. Предложенный способ пробоподготовки образцов окружающей среды применим при осуществлении обследования на наличие возбудителя чумы капсульной и бескапсульной форм разнообразных потенциально инфицированных объектов биотической (животные и эктопаразиты, вовлеченные в чумной цикл) и абиотической природы в конкретных очагах.

Ключевые слова: чума, конструирование, диагностика, магноиммуносорбент.

Введение

Чума — зоонозная природно-очаговая особо опасная бактериальная инфекционная болезнь. Точная идентификация бактерий *Y. pestis* важна не только при выделении культур от больных чумой людей и при эпизоотологических исследованиях природных очагов. Потребность в этом возникает также при анализе «сомнительных» штаммов, выделенных в природных очагах в периодах между эпизоотиями, при определении параметров внутривидовой изменчивости для решения таксономических вопросов, при изучении длительно хранившихся измененных штаммов, а также при определении природной изменчивости внутри вида в процессе сохранения его во времени в различных природных условиях. При изучении природных очагов чумы широко используют традиционные серологические методы, направленные на поиск *F1* чумного микроба. Однако такие факты, как выделение атипичных фракционных (*Fra*⁻) штаммов возбудителя чумы практически во всех известных природных очагах, доказанная измен-

чивость типичных чумных штаммов под воздействием различных факторов, процесс деградации фракции *I*, присутствующей в объектах окружающей среды, наличие в пробе посторонних реагентов, влияющих на взаимодействие антиген-антитело, могут быть причиной различных результатов серодиагностики.

Исследование с помощью иммунологических тестов, основанных на использовании высокоспецифичного *F1*-антигена и антител к нему, не всегда надежно и может привести к ложноположительным, а в худшем — к ложноотрицательным результатам [2]. Поэтому разработка и внедрение в практику диагностических препаратов, ориентированных на выявление не только *F1 Y. pestis*, но и других его специфических антигенов, остается актуальной проблемой до сих пор.

В настоящее время для индикации возбудителей инфекционных болезней при обработке проб из объектов окружающей среды возникают трудности, так как в этих случаях необходимо избавиться от посторонних примесей и максимально сконцентрировать искомый антиген. Одним из приоритетных направлений в лабораторной диагностике инфекционных болезней является разработка высокоэффективных способов концентрирования патогенов и их элиминации из исследуемого материала с последующей детекцией серологическими, генетическими, бактериологическими методами. Применение иммуномагнитной сепарации дает большие преимущества по сравнению с традиционными методами концентрирования (фильтрацией или центрифугированием) при индикации микроорганизмов непосредственно

© 2023 г. Семирчева А.А., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Русанова Д.В., Гаркуша Ю.Ю., Жданова Е.В., Жарникова И.В.

* Автор для переписки:

Семирчева Анастасия Александровна
младший научный сотрудник научно-производственной лаборатории
препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ
Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора
E-mail: a.semircheva@yandex.ru

в исследуемом материале. Основа методологии заключается в использовании магнитных частиц с иммобилизованными на их поверхности антителами, что обуславливает возможность эффективного распознавания возбудителей и их выделение из сложных биологических образцов. Таким образом, расширение арсенала бивалентных медицинских иммунобиологических препаратов для экспрессных методов детекции типичных и измененных в антигенном отношении штаммов чумного микроба остается актуальным.

Цель работы — разработка высокоспецифичных диагностических иммунобиологических препаратов и эффективных методических приемов для выявления типичных и дефектных по синтезу антигена *F1* штаммов *Y. pestis*.

Материалы и методы

При выполнении работы использованы 27 штаммов микроорганизмов I—IV групп патогенности разных родов и видов. Концентрацию выросших микробных клеток определяли турбидиметрически (с использованием стандарта мутности ОСО 42-28-85П).

Для получения кроличьей поливалентной гипериммунной сыворотки разработана схема иммунизации с иммуномодуляторами тималином и циклофосфаном, основанная на сочетании оптимальной антигенной комбинации: капсульный антиген *F1*; белки микробных клеток, солюбилизированные карбамидом; водно-солевой экстракт из афракционного штамма *Y. pestis* EV 5.

Оценку специфичности полученных бивалентных иммунных сывороток проводили в непрямой реакции иммунофлуоресценции на гетерологичных штаммах: *Y. pseudotuberculosis* I—IV серовары, *Escherichia (E.) coli*, *Y. enterocolitica*, *Francisella (F.) tularensis*, *Brucella (B.) suis*, *B. abortus*, *B. melitensis*, *Salmonella*, *Shigella*). Для удаления перекрестно реагирующих антител проведена сорбция сыворотки алюмосиликатным магнитным иммуносорбентом, белковым лигандом при этом служил водно-солевой экстракт из штамма *Y. pseudotuberculosis* III серовара [4]. Полученная сыворотка явилась высококачественным биологическим сырьем для конструирования на её основе ряда диагностических препаратов для детекции *Y. pestis* (капсульной и бескапсульной форм). Конъюгацию иммуноглобулинов G (*IgG*) с индикаторным ферментом — пероксидазой хрена (тип IV—A, R_z — 3,0 с активностью 1550 units/mg, Sigma) проводили по методу периодатного окисления.

Для конструирования иммуноглобулинового чумного магнитного сорбента использовали стандартный образец магносорбента (СО 007-9388-2015), разработанный нами к настоящему времени [6].

Для подтверждения воспроизводимости и достоверности полученных при исследовании результатов проводили математическую обработку результатов экспериментов в программе Microsoft Excel, производя расчет значений средней квадратичной ошибки отдельного измерения, выборочной дисперсии, вероятного квадратичного отклонения, при двух степенях свободы с доверительной вероятностью 0,95.

Результаты и обсуждение

Нами определены оптимальные условия изготовления эритроцитарного бивалентного чумного иммуноглобулинового диагностикума: конъюгирующим реагентом определен вторичный алкилсульфат натрия в концентрации 2%; температура сенсibilизации иммуноглобулинов, фракционированных каприловой кислотой, с эритроцитами — 45 °С; рН раствора при сенсibilизации — 5,0. Контроль специфической активности семи экспериментальных серий диагностикума при проведении межлабораторных испытаний продемонстрировал их чувствительность не менее $2,5 \times 10^6$ микробных клеток на 1 мл (м.к./мл) как для капсульных, так и для дефектных по синтезу *F1* штаммов чумного микроба в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА). При изучении специфичности диагностикума констатировано отсутствие реакции с гетерологичными штаммами микроорганизмов.

Для повышения чувствительности методов исследования и достоверности результатов обычно применяют этап дополнительного концентрирования или отделения исследуемого материала от контаминантов (пробоподготовка). Принципиально новым подходом к решению этой задачи является применение магнитоуправляемых иммуносорбентов (МИС). Использование иммуносорбентов с магнитными свойствами дает возможность одновременно провести специфическое концентрирование проб, легко и эффективно отмыть исследуемый материал от посторонних примесей, влияющих на прохождение реакции.

Многолетние исследования в этой области привели к созданию и внедрению в практику МИС, предназначенных для селективного концентрирования возбудителей особо опасных и других инфекций бактериальной и вирусной природы из объектов окружающей среды с последующей постановкой иммуноферментного анализа (ИФА). С целью стандартизации магноиммуносорбентных диагностических препаратов и налаживания их производственного выпуска нами проведена разработка стандартного образца (СО) композиционного магносорбента (МС) [1, 5, 7].

Приготовление МС проводили по разработанной нами технологии, состоящей из пяти основных стадий:

гидратации компонентов; термообработки геля; механического измельчения МС; химического активирования поверхности МС; иммобилизации IgG, выделенных из кроличьих иммунных сывороток ПЭГ-6000, на поверхности МС. Сорбционным материалом служил алюминий кремнекислый мета, магнитный компонент — оксид железа (II). Модифицирование поверхности сорбента осуществляли в присутствии полимера — декстрана и вторичного алкилсульфата натрия (ПАВ). Проведенные исследования позволили установить следующие оптимальные условия синтеза: соотношение алюмосиликат: FeO — 1:2, соответственно; время гелеобразования — 2 ч; pH гелеобразования — 7,0; проведение термообработки при 100–110 °С в течение 30 мин. Для получения частиц контролируемого размера измельчение МС проводили на шаровой планетарной мельнице Fritsch P-7 (Германия) методом сухого размола, используя стаканы и мелющие шары из диоксида циркония. Оптимальными адсорбционными свойствами обладали образцы МС, измельченные в течение 3 мин, с размерами частиц $3,8 \pm 0,5$ мкм, которые адсорбировали $1,0 \pm 0,2$ мг/мл IgG на 1 мл взвеси сорбента.

Используя технологическую схему производства СО МС, мы изготовили иммуноглобулиновый магнимоносорбент для избирательного концентрирования типичных и дефектных по синтезу F1 штаммов возбудителя чумы в объектах окружающей среды и их выявления в иммуноферментном анализе. Оценка чувствительности полученного чумного бивалентного МИС проведена в лабораторных условиях на чистых культурах возбудителя чумы, типичных и атипичных по синтезу F1. При изучении специфичности МИС использовали штаммы различных гетерологичных микроорганизмов. При проведении ИФА с предварительной пробоподготовкой на МИС удалось обнаружить фракционные и дефектные по синтезу F1 штаммы чумного микроба в концентрации $1,0 \times 10^2$ — $1,0 \times 10^3$ м.к./мл. Все изготовленные серии МИС не выявляли в ИФА гетерологичные штаммы в концентрации $1,0 \times 10^5$ м.к./мл. Результаты исследования искусственно контаминированных проб (почва, погадки хищных птиц) и полевого материала (блохи грызунов) свидетельствовали о возможности обнаружения типичных и дефектных по синтезу F1 штаммов возбудителя чумы в концентрации $1,0 \times 10^3$ м.к./мл; при этом гетерологичные микроорганизмы выявлены не были.

Исследования в полевых условиях проводили в Центральном-Кавказском природном очаге чумы на базе Эльбрусского отряда Кабардино-Балкарской противочумной станции Роспотребнадзора весной 2017 г. Детекцию чумного микроба осуществляли при исследовании блох

Citellophilus tesquorum, собранных с каждого грызуна или из одной норы. Антиген возбудителя чумы был обнаружен в трех пробах. В этих же образцах получен положительный результат при исследовании эктопаразитов молекулярно-генетическим методом, используя набор реагентов для выявления ДНК *Y. pestis* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс *Yersinia pestis-F1*». Для исключения ложноположительных результатов при исследовании эктопаразитов были проведены экспериментальные исследования в реакции МИС+ИФА. Из инсектария лаборатории медицинской паразитологии ФКУЗ Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора были получены интактные имаго пивших блох *Citellophilus tesquorum* и *Xenopsylla cheopis*. Положительно реагирующих проб блох выявлено не было.

После фиксации искомого патогена на аффинном сорбенте и последующей его индикации, например, в ИФА, отпадает необходимость в традиционном использовании полистироловых микроплат, так как сам МИС выступает в качестве твердой фазы при проведении реакции. При постановке же серологической реакции, такой как РНГА, предварительно нужно провести десорбцию антигена с поверхности сорбента, сохранив его нативные свойства. Разработан способ элюции искомого патогена после предварительного концентрирования на аффинном сорбенте для последующего исследования в серологической реакции, используя один из растворов: 1%-ный раствор пепсина, pH 6,2; 2%-ный раствор твин 20, pH 5,6; 0,03 М раствор калия едкого, pH 11,4; 60%-ный раствор ацетонитрила, pH 8,5; ТРИС-ЭДТА буфер, pH 8,9. При этом значительно повышается чувствительность и специфичность РНГА.

Заключение

В последнее десятилетие в мире отмечено сохранение напряженной эпидемиологической ситуации по чуме [3]. Проблема лабораторного обеспечения диагностики чумы, получение надежной и оперативной информации об эпизоотологической и эпидемиологической обстановке в природных очагах этой инфекции остаются чрезвычайно актуальными. Особая роль в наборе лабораторных методов принадлежит экспрессным и ускоренным методам диагностики, адаптированным для прямого исследования самых разнообразных объектов биотической и абиотической природы. В связи с этим устойчивый потенциал особо опасных инфекций, в том числе чумы, свидетельствует об актуальности вопроса

повышения эффективности лабораторной диагностики и необходимости практического внедрения новых и усовершенствованных диагностических технологий.

Приведенные в работе данные позволяют сделать заключение, что конструирование диагностических препаратов, ориентированных на выявление капсульных и бескапсульных штаммов возбудителя чумы, является перспективным исследованием. Предложенный способ пробоподготовки, осуществляемой путем избирательного концентрирования на МИС, имеет преимущество, позволяющее быстро и легко обнаруживать *Y. pestis* в образцах окружающей среды и эктопаразитах грызунов (блохах) одновременно фракционные и афракционные штаммы чумного микроба в ИФА. Это имеет большое значение при эпидемиологическом и эпизоотологическом обследовании очагов чумы, так как позволяет реализовать возможность обнаружения естественных или генетически модифицированных штаммов возбудителя чумы, типичных и атипичных по синтезу капсульного антигена *F1*, в образцах окружающей среды, что дает дополнительную информацию, повышает эффективность и качество лабораторной диагностики чумы.

Литература

1. Гаркуша Ю.Ю., Тюменцева И.С., Курчева С.А. и др. Определение стабильности основных показателей качества стандартного образца магносорбента // *Здоровье населения и среда обитания*. — 2018. — № 7(304). — С. 48–51.
2. Лебедева С.А., Трухачев А.Л. Виды изменчивости *Y. pestis*, затрудняющие детекцию и идентификацию / *Варибельность возбудителя чумы и проблемы его диагностики*. Сборник научных статей. Под общей редакцией д.м.н., проф. Ю.М. Ломова. — Ростов-на-Дону. — 2009. — С. 153–185.
3. Попов Н.В., Карнаухов И.Г., Кузнецов А.А. и др. Совершенствование эпидемиологического надзора за природными очагами чумы Российской Федерации и прогноз их эпизоотической активности на 2003 г. // *Проблемы особо опасных инфекций*. — 2023. — № 1. — С. 67–74.
4. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Курчева С.А. и др. Разработка иммунодиагностических препаратов для детекции возбудителя чумы (капсульной и бескапсульной форм) // *Здоровье населения и среда обитания*. — 2020. — № 4(325). — С. 64–68.
5. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Ляпустина Л.В. и др. Иммуномагнитные сорбенты для экспресс-диагностики опасных инфекционных заболеваний: аспекты биотехнологии и опыт применения // *Проблемы особо опасных инфекций*. — 2009. — № 3(101). — С. 59–61.
6. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Старцева О.Л. и др. Разработка стандартных условий биотехнологии произ-

водства иммуномагнитного сорбента для экспресс-диагностики опасных инфекционных заболеваний // *Технологии живых систем*. — 2017. — Т. 14. — № 2. — С. 52–58.

7. Тюменцева И.С., Кальной С.М., Афанасьев Е.Н. и др. Способ получения стандартного образца магнитного сорбента для конструирования медицинских иммунобиологических препаратов. Патент РФ 2.652.231; опубл. 25.04.2018. — Бюл. № 25. — 13 с.
8. Тюменцева И.С., Курчева С.А., Афанасьев Е.Н. и др. Особенности пробоподготовки с использованием иммуномагнитного сорбента при исследовании полевого материала на наличие возбудителя чумы // *Военно-медицинский журнал*. — 2018. — Т. 339. — № 5. — С. 42–46.

References

1. Garkusha YuYu, Tyumentseva IS, Kurcheva SA i dr. Opredeleniye stabil'nosti osnovnykh pokazateley kachestva standartnogo obraztsa magnosorbenta. *Zdorov'ye naseleniya i sreda obitaniya* 2018; 7(304):48–51 (in Russian).
2. Lebedeva SA, Trukhachev AL. Vidy izmenchivosti *Y. pestis*, zatrudnyayushchiye detektsiyu i identifikatsiyu. *Variabel'nost' vzbuditelya chumy i problemy yego diagnostiki*. *Sbornik nauchnykh statey. Pod obshchey redaktsiyey dmn, prof YuM Lomova*. Rostov-na-Donu 2009: 153–185 (in Russian).
3. Popov NV, Karnaukhov IG, Kuznetsov AA i dr. Sovershenstvovaniye epidemiologicheskogo nadzora za prirodnyimi ochagami chumy Rossiyskoy Federatsii i prognoz ikh epizooticheskoy aktivnosti na 2003 g.. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2023; 1:67–74 (in Russian).
4. Tyumentseva IS, Afanas'yev YeN, Kurcheva SA i dr. Razrabotka immunodiagnosticheskikh preparatov dlya detektsii vzbuditelya chumy (kapsul'noy i beskapsul'noy form). *Zdorov'ye naseleniya i sreda obitaniya* 2020; 4(325):64–68 (in Russian).
5. Tyumentseva IS, Afanas'yev YeN, Lyapustina LV i dr. Immunomagnitnyye sorbenty dlya ekspress-diagnostiki opasnykh infektsionnykh zabolevaniy: aspekty biotekhnologii i opyt primeneniya. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2009; 3(101):59–61 (in Russian).
6. Tyumentseva IS, Afanas'yev YeN, Startseva OL i dr. Razrabotka standartnykh usloviy biotekhnologii proizvodstva immunomagnitnogo sorbenta dlya ekspress-diagnostiki opasnykh infektsionnykh zabolevaniy. *Tekhnologii zhivyykh sistem* 2017; 14(2):52–58 (in Russian).
7. Tyumentseva IS, Kal'noy SM, Afanas'yev YeN i dr. Sposob polucheniya standartnogo obraztsa magnitnogo sorbenta dlya konstruirovaniya meditsinskikh immunobiologicheskikh preparatov. Patent RF 2.652.231; opubl. 25.04.2018. — Byul. № 25. — 13 s (in Russian).
8. Tyumentseva IS, Kurcheva SA, Afanas'yev YeN i dr. Osobennosti probopodgotovki s ispol'zovaniyem immunomagnitnogo sorbenta pri issledovanii polevogo materiala na nalichiy vzbuditelya chumy. *Voyenno-meditsinskiy zhurnal* 2018; 339(5):42–46 (in Russian).

DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC DRUGS AND METHODOLOGICAL APPROACHES FOR THE DETECTION OF *YERSINIA PESTIS* (CAPSULE AND CAPSULE-FREE FORMS)

A.A. SEMIRCHEVA, I.S. TYUMENTSEVA, E.N. AFANASYEV, D.V. RUSANOVA,
Yu. Yu. GARKUSHA, E.V. ZHDANOVA, I.V. ZHARNIKOVA

Stavropol Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Stavropol

The authors of the article describe the development of immunodiagnostic drugs for the detection of *Y. pestis* (capsule and capsule-free forms), which make it possible to detect typical and antigenically modified strains of the plague microbe with a positive and/or negative expression of «fraction 1». The effectiveness of the use of plague immunomagnetic sorbent has also been confirmed, which provides selective concentration of material with a low pathogen content and purification of samples from possible contamination by extraneous microflora in laboratory and field conditions. The proposed method of sample preparation of environmental samples is applicable when conducting an examination for the presence of the causative agent of capsular and capsule-free forms of various potentially infected objects of biotic (animals and ectoparasites involved in the plague cycle) and abiotic nature in specific foci.

Keywords: plague, design, diagnostics, magnoimmunosorbent.

Address:

Semircheva A.A.

Junior Researcher of the research and production laboratory
of preparations for diagnosing particularly dangerous and other
infections, Stavropol Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор
E-mail: a.semircheva@yandex.ru

Для цитирования:

Семирчева А.А., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Русанова Д.В., Гаркуша Ю.Ю., Жданова Е.В., Жарникова И.В. Разработка диагностических препаратов и методических приемов для детекции *Yersinia pestis* (капсульной и бескапсульной форм). Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(4):66–70.

For citation:

Semircheva A.A., Tyumentseva I.S., Afanasyev E.N., Rusanova D.V., Garkusha Yu.Yu., Zhdanova E.V., Zharnikova I.V. Development of diagnostic drugs and methodological approaches for the detection of *Yersinia pestis* (capsule and capsule-free forms). Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(4):66–70 (in Russian).

ПОИСК В-ЗАВИСИМЫХ ЭПИТОПОВ S БЕЛКА ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА КУР, ОПТИМАЛЬНЫХ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ШТАММ-СПЕЦИФИЧНЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВАКЦИН

Ф. ЯН¹, А.С. КИЛЬП³, Т.Е. МИРОНОВА^{2,3*}, К.В. АН³, В.Н. АФОНЮШКИН^{2,3}, В.Ю. КОПТЕВ³

¹ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный университет»,

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск;

³Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН,
Новосибирская область, Новосибирский район п. Краснообск

Было предсказано наличие полиэпитопного участка белка S вируса инфекционного бронхита кур, который содержит Т и В зависимые эпитопы. Данный участок перекрывает 2 альфа-спирали и 2 петли. N и C-концевые участки содержат консервативные участки, которые пригодны для отжига универсальных праймеров. Высокое антигенное разнообразие вируса инфекционного бронхита кур требует быстрой разработки новых вакцин, содержащих уникальные штамм-специфичные участки протективных антигенов. Нами были применены методы биоинформатики для анализа В-клеточных антигенных эпитопов белков S1. Данный анализ позволяет теоретически исследовать их способность противостоять IBV и клонировать их в плазмиду pBE-S для подтверждения их иммунной активности на живых моделях. Полученные данные могут быть использованы для создания рекомбинантных вакцин на основе энтероинвазивных бактерий, с целью праймирования штамм-специфичными протективными антигенами, перед применением классических более иммуногенных вакцин.

Ключевые слова: S1 белок, ИБК, эпитопы, праймеры, рекомбинантная вакцина, *Coronaviridae*.

Введение

Вирус инфекционного бронхита птиц (Infectious bronchitis virus- IBV) является вирусом рода *Gammacoronavirus* семейства *Coronaviridae* и содержит одноцепочечную РНК положительной полярности ((+)ssRNA) [14]. IBV вызывает острое высококонтагиозное респираторное заболевание домашней птицы, известное как инфекционный бронхит (ИБ), который причиняет серьезный экономический ущерб птицеводству [7]. Длина генома IBV составляет около 27,6 Кб и включает в себя четыре структурных белка: белок малой оболочки (Е), белок мембраны (М), белок нуклеокапсида (N) и белок шипа (S). Субъединицы S1 и S2 образуются путем посттрансляционного процессинга белка-предшественника S [8]. Белок S1 является наиболее вариабельным среди всех белков IBV и содержит клеточно-адсорбированные и серотип-специфические антигенные участки [18]. Широкое разнообразие антигенных типов связано с различиями в аминокислотной последовательности

протеина S1 [6]. Даже незначительное изменение в ее последовательности ведет к появлению нового антигенного типа. Установлено, что у четырех различных серотипов отличие в аминокислотной последовательности гена S1 составляет только 2–3% [2, 3]. Новые штаммы регулярно появляются и могут также быстро исчезать.

Белок S1 стимулирует выработку нейтрализующих и ингибирующих гемагглютинацию антител и стал целевым геном в молекулярной эпидемиологии и исследованиях вакцин против IBV. В настоящее время контроль за болезнью инфекционного бронхита у птиц в основном осуществляется с помощью аттенуированных и инактивированных вакцин. Однако имеются доказательства того, что широкое использование данных вакцинных систем может приводить к ускоренной мутации IBV, что требует более точных стратегий иммунизации и выбора других подходящих вакцин и эффективных методов иммунизации [17].

Для контроля инфекционного бронхита, вызванного новыми штаммами IBV, мы считаем перспективными разработку и применение рекомбинантной пероральной вакцины на основе энтероинвазивных бактерий рода *Bacillus* в качестве носителя. Мы считаем, что пероральное введение вакцины является простым и легко реализуемым на практике методом, который способен стимулировать иммунитет слизистых оболочек [11] в отношении протективных и

© 2023 г. Ян Ф., Кильп А.С., Миронова Т.Е., Ан К.В., Афонюшкин В.Н., Коптев В.Ю.

* Автор для переписки:

Миронова Татьяна Евгеньевна

м. н. с. сектора молекулярной биологии ИЭВСиДВ СФНЦА РАН

E-mail: mironovatanya9@gmail.com

штамм-специфичных антигенов. Среди микроорганизмов, применяемых в оральных вакцинах, бактерия *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) признана относительно экологически чистым носителем с эффективной системой секреции белка и адаптивным метаболизмом. Кроме того, данный микроорганизм способен продуцировать споры в относительно жестких условиях [21]. Эта технология успешно применяется в различных производствах, включая производство вакцин [12]. Использование *B. subtilis* в качестве переносчика вакцинных антигенов является оптимальным решением благодаря ее эффективной системе секреции белка, адаптивному метаболизму и способности к продукции спор, которые обеспечивают сохранность и стабильность вакцин при транспортировке и хранении в неблагоприятных условиях [10].

Эпитопные вакцины стали одним из новых направлений в разработке вакцин за последние годы. Они безопасны и эффективны, не имеют недостатков слабовирулентных вакцин, не страдают от базовых мутаций и генетической рекомбинации, могут вызывать как гуморальный, так и клеточный иммунитет, и обладают преимуществом концентрации иммунного воздействия на высококонсервативных специфических антигенных эпитопах [22].

Цель данного исследования: разработать систему праймеров, обеспечивающих клонирование В-зависимого домена вариативной области S- белка в составе шаттл-вектора pBES.

Материалы и методы

Работа выполнялась на базе лаборатории фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и в секторе молекулярной биологии Сибирского федерального центра агrobiотехнологий РАН. Используемые штаммы микроорганизмов рода *Bacillus* были представлены коллекцией культур лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН и ООО «СибАФ».

Геномные последовательности в данном исследовании были взяты из Национального центра биотехнологической информации (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Анализ нуклеотидных последовательностей проводился с использованием программы Unipro UGENE v. 43.0. и Vector NTI 11.0. Выравнивание последовательностей и построение филогенетического дерева осуществлялись с помощью программы MEGAX.

Модель белка была получена из базы данных Swiss model (<https://swissmodel.expasy.org/>). Анализ субклеточной локализации белка S1 проводился с использованием метода DeepLoc 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/>

services/DeepLoc-2.0/) и метода Phobius [15] с использованием онлайн-ресурса (<https://phobius.sbc.su.se/index.html>).

Для поиска эпитопов, зависимых от В гена, использовалась база данных Immune Epitope Database (IEDB) (<http://www.iedb.org>).

Результаты исследования

Анализ оптимального участка антигена для создания рекомбинантной вакцины

В качестве целевого антигена для рекомбинантной вакцины против IBV был выбран ген IBV-S1 (AAD34711.1). Поиск В- и Т-зависимых эпитопов данного белка с помощью программы IEDB позволил выявить 15 В-зависимых эпитопов (в отношении которых предсказывается образование и прикрепление антител) (рис. 1). Т-зависимых эпитопов было выявлено 9, и часть из них содержала эпитопы распознавания Т-хелперами.

```
>AAD34711.1 spike glycoprotein precursor [Infectious bronchitis virus]
HRSRRSVNENVTNCPYVSYGKFCIKPDGSVSPVMPKELEQFVAPLLNVTEN
VLIPNSFNLTVTDEYIQTHMDKIQINCLQYVCGNSLACRKLFFQQYGPVCD
NILSVNSVVGQKEDMELLSFYSSTKPSGFNTPVFSNLSTGEFNISLLLTTPS
SPRGRSFIEDLLFTSVESVGLPTDEAYKKCTAGPLGFLKDLACAREYNGLLV
LPPIIAEMQTLTYSSLVVSMAFGGITSAGAIPFATQLQARINHLGITQSLLL
KNQEKIAASFNKAIGHMQEGFRSTSLALQIQIDVWNKQSAILTETMLAL
NKNFGAISSVIQDIYQQLDDIQADAQVDRDLITGRLLSLSVLASAKQSEYIR
VSQQRELATQKINECVKQSIRYSFCGNGRHLVLTIPQNAAPNGIVFIHFTYT
PESFINVTAVVGFVSPANASQYAIVPANGRGIFIQVNGSYYITARDMYM
PRDITAGDIVTLTSCQANYVSVNKTVITTFVDNDDFDDELKWWNET
KHLPDFDQFNYPVLNITYDIDKIEVIKGLNDSLIDLETLSILKTYIKWPW
YVWLAIFFAIIFILIGWVFFMTGCCGCCGCGFIIPLMSKCGKSSYYTTF
DNDVTEQYRPKKS
```

Рис. 1. Анализ эпитопов белка IBV-S1. *Примечание:* светло-розовый — В эпитоп, светло-зеленый — Т эпитоп, розовый — В и Т эпитоп, зеленые эпитопы Т хелперов. Данные по цвету — лично с авторами

В качестве объекта исследования был взят поли-эпитопный участок S белка IBV, содержащий три участка, включающих в себя перекрывающиеся Т и В эпитопы, локализация объекта клонирования — 115—200 а.а. в AAD34711.1.

Поиск трансмембранных доменов белка S и сигнальных пептидов, влияющих на внутриклеточную локализацию

Как следует из результатов предсказания субклеточной локализации S1 белка возбудителя инфекционного бронхита кур, возможна локализация данного белка на поверхности клетки, в эндоплазматическом ретикулуме, комплексе Гольджи и лизосомах. Вероятность секреции данного белка за пределы клетки выглядит менее вероятной.

Аминокислотная последовательность клонируемого участка белка S IBV

Фрагмент	Последовательность аминокислот
IBV_S1	DMELLSFYSSTKPSGFNTPVFSNLSTGEFNISLLLLTTPSSPRGRSFIEDLLFTSVESVGLP TDEAYKKCTAGPLGFLKDLACAREY

Результаты анализа субклеточной локализации отдельных белков

Protein	Cytoplasm	Nucleus	Endoplasmic reticulum	Cell membrane	Mitochondrion
IBV_S1	0,257	0,108	0,814	0,613	0,116
Protein	Plastid	Extracellular	Lysosome/Vacuole	Golgi apparatus	Peroxisome
IBV_S1	0,011	0,083	0,598	0,709	0,034

С использованием метода предсказания транс- мембранной локализации белка и поиска сигнальных пептидов в составе аминокислотной последовательности белка (метод Phobius) [15] было выявлено два локуса трансмембранной локализации и наличие сигнальной последовательности в N-концевой части белка (рис. 2).

Таким образом, данный белок может быть секрет- ируемым, и он потенциально может самостоятельно локализоваться на поверхности клетки.

Изучение изменчивости клонируемого фрагмен- та S белка IBV

Как следует из результатов анализа алигмента — интересующего нас фрагмента белка S, середина этой по- следовательности характеризуется наличием множества

не- синонимических замен (рис. 3). N- и C-концевые участки более консервативны, что позволяет разработать универсальные праймеры, пригодные для клонирования фрагмента разных штаммов IBV.

Как видно на рисунке 4, клонируемая последова- тельность затрагивает две относительно консервативные альфа спирали и две петли.

Разработка стратегии клонирования полиэпи- топного фрагмента белка S-IBV

Для клонирования нами была разработана пара универсальных праймеров (табл. 3). Праймеры содержат в своем составе сайты рестрикции BamH I и Hind III, обеспечивающие клонирование выбранного фрагмента в плазмиду pBE-S.

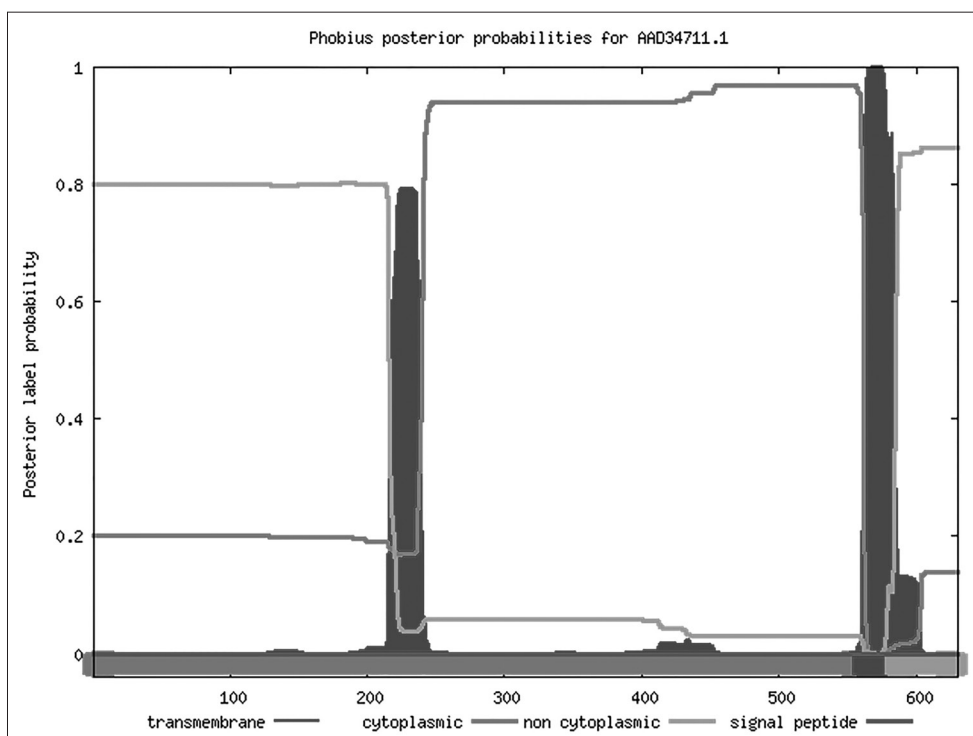


Рис. 2. Анализ по методике Phobius для белка IBV S1 (AAD34711.1)

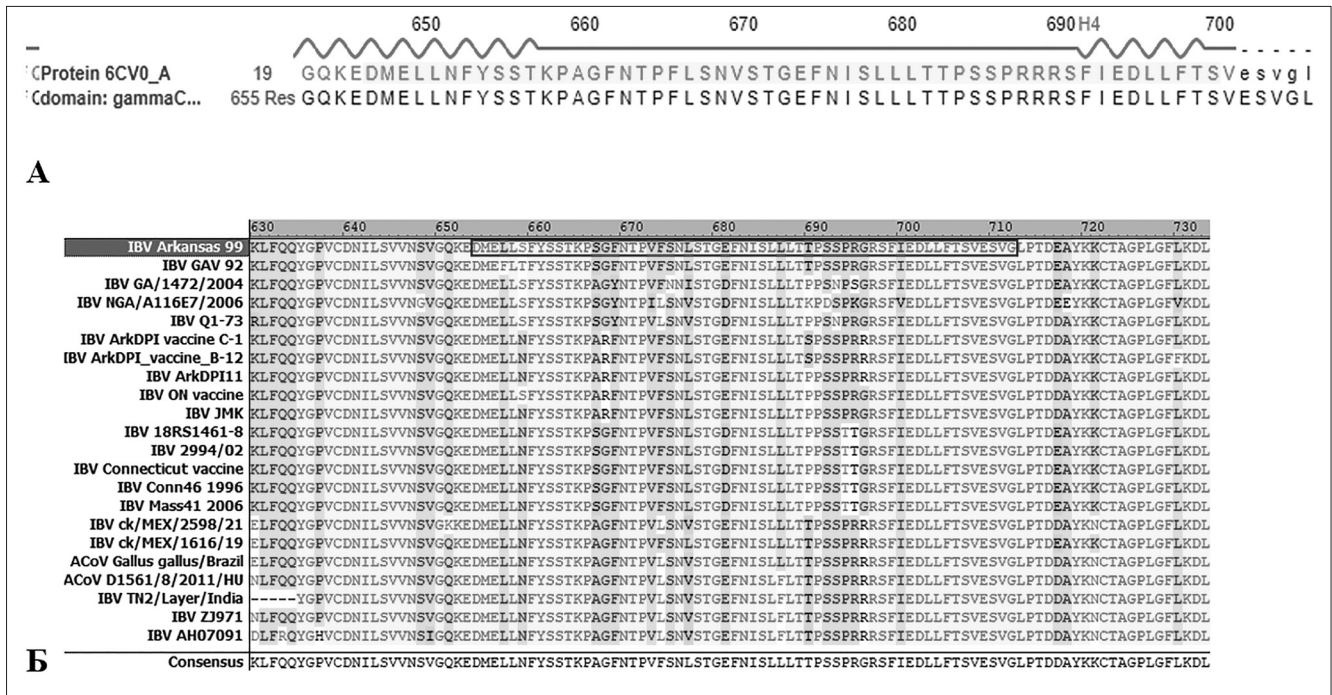


Рис. 3. Результаты выравнивания аминокислотных последовательностей участка S белка IBV. Примечание: А — доменная структура клонируемого фрагмента (красные спирали соответствуют альфа спиралям, синяя линия — петли), Б — алигмент аминокислотных последовательностей (желтым отмечены консервативные участки, синим, зеленым и белым — более вариабельные участки белка). Требуется просмотр цветного оригинала у автора

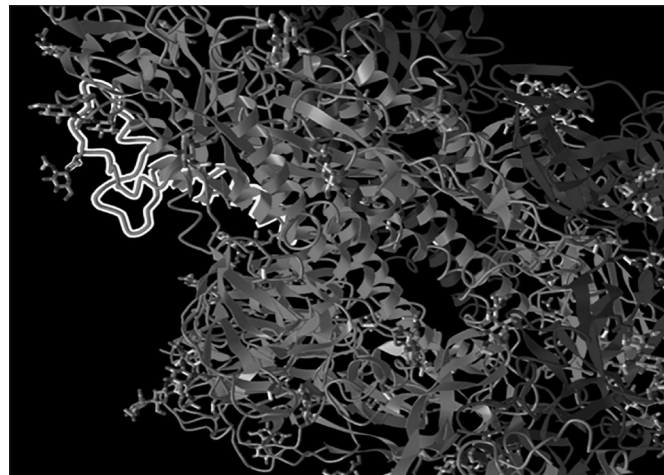


Рис. 4. Трехмерная структура белка S1 и локализация клонируемой последовательности аминокислот (желтый цвет — работа с авторами)

Таблица 3

Разработанные универсальные праймеры, пригодные для клонирования фрагмента разных штаммов IBV

Название	Последовательность
Fwd IBV_S1	5'- gagGGATCCgggGATATGGA ACTTTTAAGCTTC-3'
Rev IBV_S1	5'- gacAAGCTTgggATATTCACGAGCACATGC -3'

Примечание: жирным шрифтом выделена последовательность, необходимая для клонирования в плазмиды pBE-S с использованием рестриктаз BamH I и Hind III, где маленькие буквы являются защитными основаниями, заглавные буквы в нечетных числах — это сайт рестрикции фермента BamH I, а заглавные буквы в четных числах — это сайт рестрикции фермента Hind III. Последовательности, специфичные для областей гена, указаны обычным шрифтом

Программа амплификации выглядит следующим образом: при температуре 95 °С – 3 минуты, затем 30 циклов 95 °С – 10 секунд, 65 °С – 30 секунд, 72 °С – 20 секунд.

При условии успешного клонирования в идеальных условиях мы получим следующий профиль плазмиды (рис. 5).

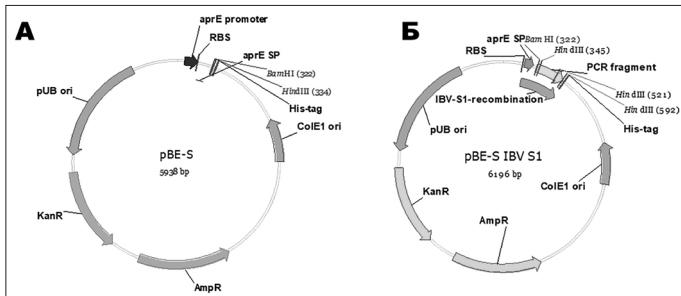


Рис. 5. Карта плазмиды pBE-S исходной (А) и со вставкой IBV_S1 (Б). *Примечание:* А: пустая плаزمида; Б: pBE-S со вставкой IBV_S1; pUB ori – ориджин для рода *Bacillus* (сайт старта начала репликации плазмиды); ColE1 ori – ориджин для *Escherichia coli*; KanR – ген устойчивости к канамицину (экспрессируется в бактериях рода *Bacillus*); AmpR – ген устойчивости к ампициллину (экспрессируется в *Escherichia coli*); His-tag – гистидиновый хвост на никелевых колонках для выделения рекомбинантного белка; Hind III, BamHI, – сайты рестрикции \$argE Sp; RBS – промоторная область для экспрессии белка у микроорганизмов рода *Bacillus*; IBV-S1-фрагмент антигена IBV; PCR fragment – фрагмент сделали клонирование.

Обсуждение

Концепция биотехнологического продукта заключается в следующем – мы считаем целесообразным применение энтероинвазивных бактерий в качестве средства доставки рекомбинантных антигенов и адьюванта при пероральной иммунизации [1].

Белок S частично или полностью расщепляется на аминоконцевую S1 и карбоксиконцевую S2 субъединицы посттрансляционно с помощью фуриноподобной протеазы хозяина. Субъединица S1 сильно варьирует среди различных изолятов IBV. S белок отвечает за прикрепление вируса к клетке-хозяину и содержит основные нейтрализующие эпитопы [19].

В нашем исследовании применялись методы биоинформатики для анализа белка IBV-S1, гена AAD34711.1 с целью скрининга клеточных эпитопов вируса и клонирования некоторых его фрагментов [20].

Способность вируса ИБК у птиц индуцировать поликлональную стимуляцию образования интерферона гамма, в том числе у птицы, не имеющей предварительного контакта с данным вирусом [4], можно рассматривать как важный механизм дисрегуляции иммунного ответа, приводящего к избыточному повреждению иммунной системой респираторного тракта. Известный факт, что S1 белок у некоторых коронавирусов является суперантигеном [9], требует создания эпитопных вакцин, позволяющих избежать избыточной поликлональной активации иммунокомпетентных клеток [13].

Наблюдаемое нами наличие эпитопов, перекрывающихся как для TCR CD4, CD8 Т-лимфоцитов, так и для антигенраспознающих частей антител (см. рис. 1), по нашему мнению, создают риски формирования цитокинового шторма за счет неспецифического связывания с TCR, что и подтверждается данными литературы [16].

Исходя из результатов анализа субклеточной локализации отдельных белков (см. табл. 2), можно предполагать, что TCR находится в эндоплазматическом ретикулуме, аппарате Гольджи, лизосоме и клеточной мембране, в то время как в контексте рисунка 2 мы видим, что фермент обладает трансмембранными свойствами (показано фиолетовым цветом справа от 200) и что участок до этого считается нецитоплазматическим. Белок обрабатывается и синтезируется в организме хозяина и транспортируется на мембрану, что также похоже, на то, что мы знаем о других коронавирусах, и в сочетании со сложным эпитопным антигенным профилем (см. рис. 1). Можно ли самостоятельную секрецию S белка коронавирусов рассматривать как отдельный механизм, призванный снизить эффективность иммунного ответа? Этот вопрос для нас остается неясным, но требующим дальнейшего изучения.

Способность *Bacillus subtilis* индуцировать одновременно Т- и В-клеточный иммунный ответ [5] представляется очень полезным свойством именно для рекомбинантной вакцины, содержащей как Т-, так и В-зависимые эпитопы в структуре антигена.

Заключение

В качестве рекомбинантного антигена в составе вакцины против инфекционного бронхита кур был найден полиэпитопный участок S белка IBV, содержащий три участка включающих в себя перекрывающиеся Т- и В-эпитопы (локализация объекта клонирования – 115–200 а.а. в AAD34711.1). Большое количество несинонимических замен петлевых доменов этого участка антигена сочетается с консервативными N- и C-концевыми участками (в со-

ставе альфа-спиралей). Указанная особенность данного участка S белка позволила разработать праймеры для прямого клонирования различных вариантов этого антигена в шаттл-вектор рВЕ-S как элемент генно-инженерной альтернативы аутогенной вакцины.

*Работа выполнена при поддержке гранта РНФ и НСО № 22-26-20118 «Изучение возможных механизмов формирования протективного иммунного ответа в отношении некоторых инфекционных агентов свиней и кур при пероральном введении штамма-продуцента антигенов на основе микроорганизмов рода *Bacillus*».*

Литература

1. Афонюшкин В.Н., Донченко Н.А., Коптев В.Ю., Ян Ф., Барсукова Е.Н., Козлова О.С. «Малая» биотехнология или хозяйство-ориентированная биотехнология в ветеринарии — аналог персонализированной медицины // Ветеринария. — 2022. — № 11. — С. 28–34.
2. Бочков Ю.А., Батченко Г.В., Луговская Н.Н. [и др.]. Изучение инфекционного бронхита кур в России: исторический аспект / Акт. пробл. инфекц. патол. ж-ных.: матер. Междунар. науч. конф. посвящ. 45-летию ВНИ-ИЗЖ, 30–31 окт. 2003 г. — Владимир, 2003. — С. 294–302.
3. Овчинникова Е.В. и др. Генетическая характеристика полевых изолятов вируса инфекционного бронхита кур, выявленных в России // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. — 2007. — Т. 5. — С. 303–316.
4. Ariaans M.P. et al. Infectious Bronchitis Virus induces acute interferon-gamma production through polyclonal stimulation of chicken leukocytes // Virology. — 2009. — Vol. 385. — No. 1. — P. 68–73.
5. Barnes A., Cerovic V., Hobson P. and Klavinskis L. *Bacillus subtilis* spores: A novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen // Eur. J. Immunol. — 2007. — Vol. 37. — No. 6. — P. 1538–1547.
6. Botchkov Y., Borisov A., Irza V. [et al.]. Differentiation of avian infectious bronchitis virus field isolates in Russia using molecular-biological and serological methods / 11th Europ. Poultry Conf.: Bremen, Germany. 6–10 Sept. — Bremen, Germany, 2002. — P. 176.
7. Cavanagh D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus // Veterinary research. — 2007. — Vol. 38. — No. 2. — P. 281–297.
8. Cavanagh D. Structural polypeptides of coronavirus IBV // J. Gen. Virol. — 1981. — Vol. 53. — P. 93–103.
9. Cheng M.H. et al. Superantigenic character of an insert unique to SARS-CoV-2 spike supported by skewed TCR repertoire in patients with hyperinflammation // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2020. — Vol. 117. — No. 41. — P. 25254–25262.
10. Chen H., Ullah J., Jia J. Progress in *Bacillus subtilis* spore surface display technology towards environment, vaccine development, and biocatalysis // Microbial Physiology. — 2017. — Vol. 27. — No. 3. — P. 159–167.
11. Czerkinsky C. et al. Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues // Infection and immunity. — 1989. — Vol. 57. — No. 4. — P. 1072–1077.
12. Hagmann M. Computers aid vaccine design // Science. — 2000. — Vol. 290. — No. 5489. — P. 80–82.
13. Huang K.J. et al. An interferon- γ -related cytokine storm in SARS patients // Journal of medical virology. — 2005. — Vol. 75. — No. 2. — P. 185–194.
14. Jackwood M.W., Lee D.H. Different evolutionary trajectories of vaccine-controlled and non-controlled avian infectious bronchitis viruses in commercial poultry // PLoS one. — 2017. — Vol. 12. — No. 5. — e0176709. doi: 10.1371/journal.pone.0176709.
15. Käll L., Krogh A. and Sonnhammer E. An HMM posterior decoder for sequence feature prediction that includes homology information // Bioinformatics. — 2005. — Suppl. 1. — P. i251–i257. doi: 10.1093/bioinformatics/bti1014.
16. Li H. et al. The structural basis of T cell activation by superantigens // Annual review of immunology. — 1999. — Vol. 17. — No. 1. — P. 435–466.
17. Lin S.Y., Chen H.W. Infectious bronchitis virus variants: molecular analysis and pathogenicity investigation // International journal of molecular sciences. — 2017. — Vol. 18. — No. 10. — P. 2030.
18. Mo M.L. et al. Molecular characterization of major structural protein genes of avian coronavirus infectious bronchitis virus isolates in southern China // Viruses. — 2013. — Vol. 5. — No. 12. — P. 3007–3020.
19. Niesters H.G., et al. The neutralization epitopes on the spike protein of infectious bronchitis virus and their antigenic variation // Adv. Exp. Med. Biol. — 1987. — Vol. 218. — P. 483–492.
20. Sanchez-Trincado J.L. et al. Fundamentals and methods for T- and B-cell epitope prediction // Journal of immunology research. — 2017. — Vol. 2017. — Art. 2680160. doi:10.1155/2017/2680160.
21. Su Y. et al. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine // Microbial cell factories. — 2020. — Vol. 19. — No. 1. — Art. 173. doi: 10.1186/s12934-020-01436-8.
22. Zerbe K., Moehle K., Robinson J.A. Protein epitope mimetics: from new antibiotics to supramolecular synthetic vaccines // Accounts of chemical research. — 2017. — Vol. 50. — No. 6. — P. 1323–1331.

References

1. Afonyushkin VN, Donchenko NA, Koptev VYU, Yan F, Barsukova YeN, Kozlova OS. «Malaya» biotekhnologiya ili khozyaystvo-oriyentirovannaya biotekhnologiya v veterinarii – analog personalizirovannoy meditsiny. Veterinariya 2022; 11:28–34 (in Russian).
2. Bochkov YuA, Batchenko GV, Lugovskaya NN [i dr]. Izucheniye infektsionnogo bronkhita kur v Rossii: istoricheskiy aspekt. Akt. probl. infekts. patol. zh-nykh.: mater. Mezhdunar. nauch. konf. posvyashch. 45-letiyu VNIIZZH, 30–31 okt. 2003 g. Vladimir, 2003:294–302 (in Russian).
3. Ovchinnikova YeV i dr. Geneticheskaya kharakteristika polevykh izolyatov virusa infektsionnogo bronkhita kur, vyyavlennykh v Rossii. Trudy Federal'nogo tsentra okhrany zdorov'ya zhivotnykh 2007; 5:303–316 (in Russian).
4. Ariaans MP et al. Infectious Bronchitis Virus induces acute interferon-gamma production through polyclonal stimulation of chicken leukocytes. Virology 2009; 385(1):68–73.
5. Barnes A, Cerovic V, Hobson P and Klavinskis L. *Bacillus subtilis* spores: A novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. Eur J Immunol 2007; 37(6):1538–1547.
6. Botchkov Y, Borisov A, Irza V [et al]. Differentiation of avian infectious bronchitis virus field isolates in Russia using molecular-biological and serological methods. 11th Europ Poultry Conf.: Bremen, Germany. 6–10 Sept. Bremen, Germany, 2002:176.
7. Cavanagh D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. Veterinary research 2007; 38(2):281–297.
8. Cavanagh D. Structural polypeptides of coronavirus IBV. J Gen Viro 1981; 53:93–103.
9. Cheng MH et al. Superantigenic character of an insert unique to SARS-CoV-2 spike supported by skewed TCR repertoire in patients with hyperinflammation. Proceedings of the National Academy of Sciences 2020; 117(41):25254–25262.
10. Chen H, Ullah J, Jia J. Progress in *Bacillus subtilis* spore surface display technology towards environment, vaccine development, and biocatalysis. Microbial Physiology 2017; 27(3):159–167.
11. Czerkinsky C et al. Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. Infection and immunity 1989; 57(4):1072–1077.
12. Hagmann M. Computers aid vaccine design. Science 2000; 290(5489):80–82.
13. Huang KJ et al. An interferon- γ -related cytokine storm in SARS patients. Journal of medical virology 2005; 75(2):185–194.
14. Jackwood MW, Lee DH. Different evolutionary trajectories of vaccine-controlled and non-controlled avian infectious bronchitis viruses in commercial poultry. PloS one 2017; 12(5):e0176709. doi: 10.1371/journal.pone.0176709.
15. Käll L, Krogh A and Sonnhammer E. An HMM posterior decoder for sequence feature prediction that includes homology information. Bioinformatics 2005; 1:i251–i257. doi: 10.1093/bioinformatics/bti1014.
16. Li H et al. The structural basis of T cell activation by superantigens. Annual review of immunology 1999; 17(1):435–466.
17. Lin SY, Chen HW. Infectious bronchitis virus variants: molecular analysis and pathogenicity investigation. International journal of molecular sciences 2017; 18(10):2030.
18. Mo ML et al. Molecular characterization of major structural protein genes of avian coronavirus infectious bronchitis virus isolates in southern China. Viruses 2013; 5(12):3007–3020.
19. Niesters HG, et al. The neutralization epitopes on the spike protein of infectious bronchitis virus and their antigenic variation. Adv Exp Med Biol 1987; 218:483–492.
20. Sanchez-Trincado JL et al. Fundamentals and methods for T- and B-cell epitope prediction. Journal of immunology research 2017; 2017:2680160. doi:10.1155/2017/2680160.
21. Su Y et al. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. Microbial cell factories 2020; 19(1):173. doi: 10.1186/s12934-020-01436-8.
22. Zerbe K, Moehle K, Robinson JA. Protein epitope mimetics: from new antibiotics to supramolecular synthetic vaccines. Accounts of chemical research 2017; 50(6):1323–1331.

SEARCH FOR B-DEPENDENT EPITOPES OF THE VIRAL S PROTEIN INFECTIOUS BRONCHITIS OF CHICKENS, OPTIMAL FOR THE DEVELOPMENT OF STRAIN-SPECIFIC RECOMBINANT VACCINES

F. YAN¹, A.S. KILP³, T.E. MIRONOVA^{2,3}, K.V. AN³, V.N. AFONYUSHKIN^{2,3}, V.Yu. KOPTEV³

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Novosibirsk State University»,

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk;

³ Institute of Experimental Veterinary Medicine of Siberia and the Far East SFSC RAS, Novosibirsk region, Novosibirsk district, Krasnoobsk village

The presence of a polypeptide region of the S protein of the chicken infectious bronchitis virus, which contains T and B dependent epitopes, was predicted. This region overlaps 2 alpha helices and 2 loops. The N and C terminal regions contain conserved regions that are suitable for annealing universal primers. The high antigenic diversity of chicken infectious bronchitis virus requires the rapid development of new vaccines containing unique strain-specific regions of protective antigens. We used bioinformatics methods to analyze B-cell antigenic epitopes of S1 proteins. This assay allows us to theoretically investigate their ability to resist IBV and clone them into the pBE-S plasmid to confirm their immune activity in live models. The data obtained can be used to create recombinant vaccines based on enteroinvasive bacilli, with the aim of priming with strain-specific protective antigens, before using classical, more immunogenic vaccines.

Keywords: S1 protein, IBV, epitopes, primers, recombinant vaccine, *Coronaviridae*.

Address:

Mironova T.E.

Junior researcher, Sector of Molecular Biology, Institute
of Experimental Veterinary Medicine of Siberia
and the Far East SFSC RAS

E-mail: mironovatanya9@gmail.com

Для цитирования:

Ян Ф., Кильп А.С., Миронова Т.Е., Ан К.В., Афонюшкин В.Н., Коптев В.Ю. Поиск В-зависимых эпитопов S белка вируса инфекционного бронхита кур, оптимальных для разработки штамм-специфичных рекомбинантных вакцин. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(4):71–78.

For citation:

Yan F., Kilp A.S., Mironova T.E., An K.V., Afonyushkin V.N., Koptev V. Yu. Search for B-dependent epitopes of the viral S protein infectious bronchitis of chickens, optimal for the development of strain-specific recombinant vaccines. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(4):71–78 (in Russian).

ТЕХНИЧЕСКИЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ УСТАНОВКИ ПЕРФУЗИОННОЙ ФИЛЬТРАЦИИ

О.О. СОКОЛ*, Ю. МЕХДА

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

В обзорной статье подробно описываются технические решения, реализованные в лабораторной системе перфузионной фильтрации для непрерывного культивирования культур клеток. Рассмотрены элементы системы и их технические характеристики. Приведенное описание позволяет получить общее представление о технических особенностях реализации данного типа оборудования для процессов культивирования в лабораторном масштабе.

Ключевые слова: перфузионный процесс, перфузионная система фильтрации, лабораторная система перфузионной фильтрации, перфузия, непрерывное культивирование клеток, программируемые логические контроллеры.

Введение

В предыдущей статье мы рассматривали вопрос о разработке лабораторной установки перфузии [1]. Идея была в предложении реализовать лабораторную перфузию на электромагнитных клапанах.

Задачей настоящей статьи является описать строение системы перфузии, в основном затронув технические стороны вопроса. В связи с тем, что указанная установка является сложным оборудованием, ее можно рассматривать как совокупность следующих подсистем: система тангенциального потока, фильтрация, система отбора на клапанах, КИП (датчики) и система управления [2]. Рассмотрим каждую составную часть системы более подробно.

Система фильтрации. Тангенциальный поток

Ранее традиционно применялся метод фильтрации, известный как проточная фильтрация или тупиковая фильтрация [8], и представлял собой вертикальный поток суспензии через мембрану, позволяя мелким молекулам проходить через нее и разделяться. Однако этот метод имеет недостаток, поскольку макромолекулы могут накапливаться на поверхности мембраны, образуя слой на фильтре. По мере увеличения времени фильтрации

слой становится толще, что приводит к снижению эффективности фильтрации и сокращению срока службы мембраны.

В отличие от этого метода, широкое внимание стало уделяться тангенциальной проточной фильтрации [10], где поток пробы движется горизонтально по поверхности мембраны под тангенциальным углом и непрерывно фильтруется и промывает поверхность мембраны по мере циркуляции, предотвращая накопление макромолекул и уменьшая поляризацию концентрации. Это обеспечивает стабильную скорость движения молекул и эффективно продлевает срок службы фильтрующей мембраны.

Помимо этого, тангенциальная фильтрация имеет дополнительные преимущества, так как позволяет одновременно проводить два процесса: концентрацию и диалитическую фильтрацию. Благодаря этим преимуществам проточная фильтрация все больше предпочитается традиционному способу фильтрации в биотехнологии и областях, связанных с биомедициной и фармацевтической промышленностью [9].

Напомним, что система перфузионной фильтрации необходима для ведения непрерывного процесса культивирования с задержанием клеток с помощью фильтроэлементов и возвращения их в биореактор [2, 3]. Такая установка осуществляет механизм непрерывной фильтрации с помощью тангенциального обратного потока (рис. 1). Она состоит из циркуляционного насоса с малым усилием сдвига для перекачки жидкости, фильтродержателя с фильтроэлементами и системы клапанов с датчиками давления, способствующих дополнительному промыванию фильтроэлементов и отводу фильтрата.

На рисунке 1 показан принцип работы тангенциального потока для перфузионных процессов. Тангенциальный поток обеспечивает разделение на основе размеров частиц,

предотвращая загрязнение мембраны потоком, проходящим через нее [8]. Применяется для разделения частиц и жидких веществ клеточных культур при перфузии [4].

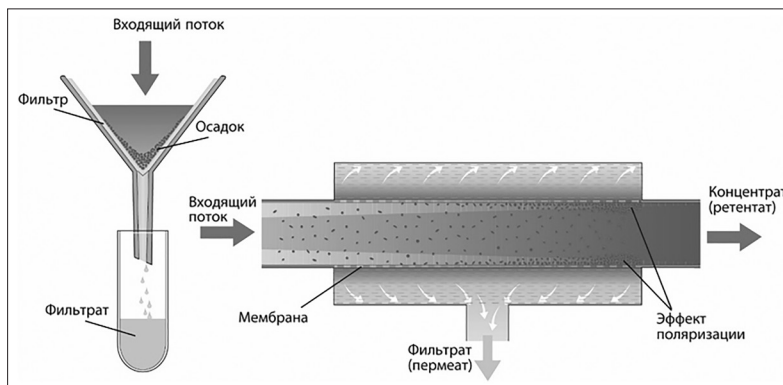


Рис. 1. Тангенциальный поток

Тангенциальная проточная фильтрация является важным методом в биотехнологической области при процессах очистки, позволяющим разделять, концентрировать и очищать биомолекулы и частицы в растворе. Большое внимание этому методу уделяется благодаря широкому применению в биофармацевтическом производстве, при очистке белков и удалении загрязняющих веществ из биологических образцов. Тангенциальная фильтрация в основном используется для концентрирования, диалитической фильтрации и фракционирования крупных молекул из меньших по размеру [6]. Жидкость прокачивается тангенциально вдоль поверхности мембраны при использовании TFF. Часть жидкости проталкивается благодаря приложенному давлению через мембрану на сторону фильтрата. При тангенциальной фильтрации

удерживаемые компоненты не скапливаются на поверхности мембраны, а уносятся тангенциальным потоком [9].

Данная система позволяет бережно и эффективно обрабатывать большие объёмы раствора, сводя к минимуму потери образца и сохраняя целостность чувствительных молекул [5, 11]. Однако важно выбрать оптимальную мембрану, подходящую для конкретного применения фильтрации.

Механизм фильтрации с тангенциальным потоком представлен на рисунке 2 и состоит из насосов для рециркуляции жидкости через волоконный фильтр. Насосы используются для добавления перфузионной среды, сбора пермеата, удаления клеток и регулируются контроллерами обратной связи.

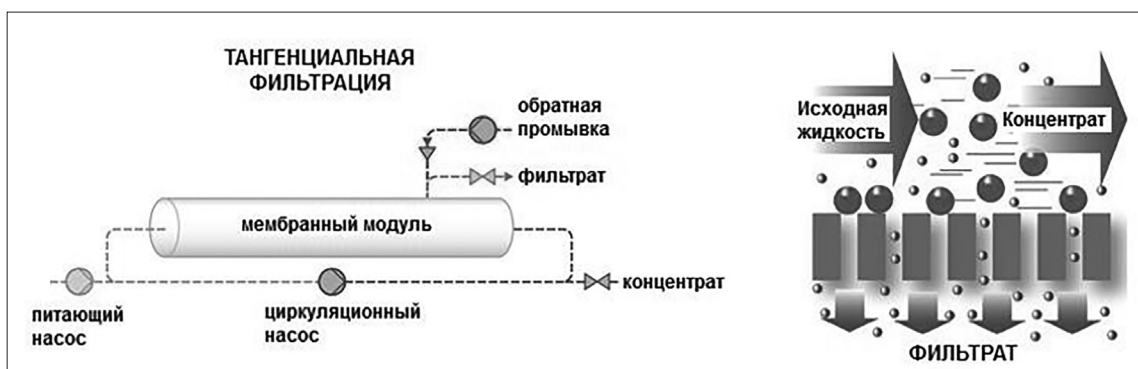


Рис 2. Механизм тангенциальной фильтрации

При проектировании лабораторной установки перфузионной фильтрации был использован мембранный модуль фирмы Cytiva (рис. 3). Такой выбор среди мембран был сделан в пользу материала полисульфона, так как предварительные опыты на мембранах из поливинилидендифторида показали более низкую степень фильтрации

клеток, независимо от среды и масштаба. Характеристики фильтра Hollow Fibre Cartridge, используемого на установке лабораторной перфузионной фильтрации: а) площадь фильтрации — $0,16 \text{ м}^2$; б) количество волокон — 300; в) внутренний диаметр волокна — $0,75 \text{ мм}$; г) рабочая длина — 30 см; д) материал волокон — полисульфон.



Рис. 3. Фильтр CYTIVA, применяемый на лабораторной установке перфузионной фильтрации

Система управления оборудованием

При создании системы управления и мониторинга лабораторной установкой перфузионной фильтрации использовался принцип, сходный с системой управления биореакторами: сенсорные технологии, позволяющие в режиме реального времени контролировать различные параметры процесса, а также применять цифровые компьютеры и приводы [7, 8].

На рисунке 4 представлена структурная блок-схема перфузионной системы фильтрации.

Как правило, такая система состоит из трех уровней управления: уровень оборудования (вход/выход), уровень управления оборудованием (контроллеры ПЛК), а также уровень мониторинга/управления. Как видно, верхний уровень управления, где отражаются параметры

всех процессов фильтрации, который состоит из совокупности физических, химических, физиологических и биохимических параметров, обеспечивает функционирование единого механизма перфузионной системы. Для некоторых физических и химических параметров, таких как температура, рН, скорость вращения мешалки, уровень кислорода, давление, уровень жидкости и вязкость, были установлены специальные функциональные датчики, с помощью которых проводился контроль процесса. При этом контроль осуществлялся с помощью классических систем управления на основе специальных исполнительных механизмов. Для физиологических и биохимических параметров, таких как биомасса, газовый состав, концентрация основных питательных веществ и метаболитов, использовались более сложные средства мониторинга.

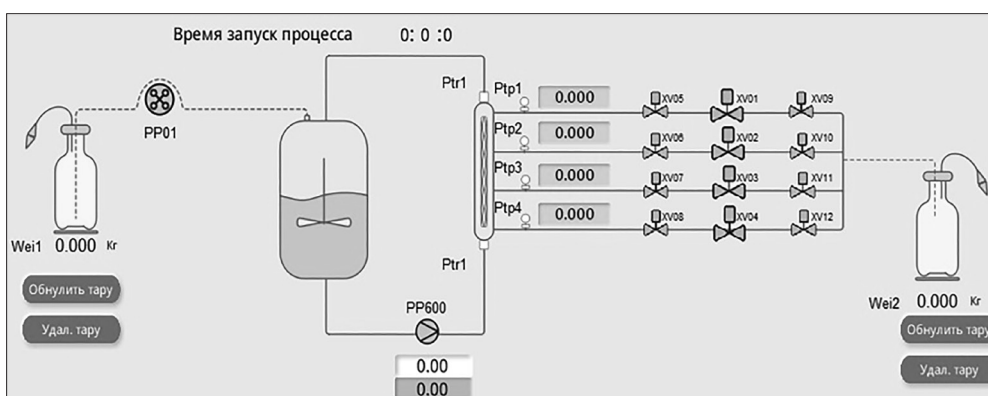


Рис. 4. Структурная блок-схема перфузионной системы фильтрации

Далее описана схема управления перфузионной установкой. В ней представлены элементы, которые обеспечивают полное и автоматическое управление перфузией. В нашем варианте система фильтрации состоит из ПЛК с микропроцессорным модулем. Функции уров-

ней управления оборудованием включают в себя: сбор аналоговых сигналов от датчиков и преобразование их в цифровые сигналы, запись данных процесса, установку параметров процесса, запуск оптимизирующих алгоритмов для управления параметрами, генерацию сигналов

для исполнительных механизмов, представление данных процесса и связь с компьютерами верхнего уровня или другими системами ПЛК.

Мониторинг позволяет отслеживать следующие параметры датчиков:

- Физические параметры: температура, давление, перемешивание, уровень пены/жидкости, вязкость, мутность, газовый поток, поток жидкости, веса.
- Химические параметры: рН/DO/ОВП, газовый состав.
- Физиологические/биохимические параметры: биомасса, морфология, содержание веществ.

Контроль дает возможность автоматически управлять данными и включает в себя следующие компоненты: клапаны, насос, двигатель, переключатели. Хранение и сбор данных происходит через USB карту, флэш-карту и сервер.

Аппаратная структура обеспечивает контроль трансмембранного давления в автоматическом режиме. В нашей установке рассматриваемая структура была реализована в классическом исполнении, которое обычно применяется в ферментерах и биореакторах и позволяет проводить контроль рН, уровня кислорода, температуры и других параметров, необходимых для выращивания клеток в лабораторных условиях. Также для записи данных ко всем датчикам был подключен блок сбора данных. С помощью аппаратной структуры поддерживается непрерывный процесс выращивания клеток, что даёт перфузии преимущество относительно других систем фильтрации, например, АТФ.

Технически принцип работы перфузии изображен на *рисунке 4* и базируется на контроле трансмембранного давления с помощью показаний датчиков давления на входе в мембрану (Ptr1), выходе из мембраны (Ptr2) и на линиях отбора пермеата (Ptrp1), (Ptrp2), (Ptrp3), (Ptrp4). Показания датчиков давления дают возможность напрямую анализировать эффективность стратегии обратной пульсации для различных размеров пор фильтров при одних и тех же исходных параметрах среды. Насос (PP600) подключен к поступающему потоку из биореактора в фильтр для обеспечения непрерывного поступления питательной среды, что обеспечивает постоянное давление между входом и выходом из мембраны. Клапаны расположены на линии пермеата (XV01, XV02, XV03, XV04) и играют важную роль для создания давления при отборе суспензии. Клапаны обеспечивают постоянный отбор пермеата из потока ретентанта. Показатели давления на линии пермеата дают оценку загрязнения мембраны (фильтра). Исходя из этих показателей, система управ-

ления принимает решение об изменении частоты хода центрального клапана. Происходит это за счет изменения давления на линии пермеата. Чем выше давление на линиях отбора пермеата, тем чаще клапаны начинают работать для обеспечения уменьшения степени забивания фильтра. Система весов расположена на выходе из линий пермеата (Wei2). Колбы с питательной средой (Wei1) расположены на весах. Среда подается с помощью перистальтического насоса (PP01) в биореактор, в результате чего в систему управления поступают показания, которые посылают команду для расчета определенного количества питательной среды для подачи в биореактор.

Заключение

Таким образом, в представленной статье были рассмотрены элементы системы и технические решения, реализованные в лабораторной системе перфузионной фильтрации для непрерывного культивирования культур клеток. Описано общее представление о технических особенностях реализации данного типа оборудования для процессов культивирования в лабораторном масштабе. В следующей статье будет рассмотрено практическое применение лабораторной установки и представлена серия опытов и экспериментов с использованием данной установки.

Литература

1. Карпова О.О., Матвеева И.Н. Вариант реализации системы лабораторной установки перфузионной фильтрации для непрерывного культивирования культур клеток // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2023. — Т. 19. — № 2. — С. 62–66.
2. Карпова О.О., Матвеева И.Н. Культивирование клеток: сравнительный анализ традиционных и инновационных технологий // Ветеринарный врач. — 2022. — № 5. — С. 14–18.
3. Морозов А.Н. Разработка технологии перфузионного культивирования клеток СНО для получения моноклональных антител к иммуноглобулину Е: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Морозов Антон Николаевич, 2019. — 162 с.
4. BioMarin Pharmaceutical, N., United States. Automated high throughput cell culture methods for the development and investigation of large scale perfusion processes — Poster 142. Paper presented at the The 25th Annual Meeting of the European Society of Animal Cell Technology, Lausanne. — 2017.
5. Hein M.D., Chawla A., Cattaneo M., Kupke S.Y., Genzel Y., Reichl U. Cell culture-based production of defective interfering influenza A virus particles in perfusion mode using an alternating

- tangential flow filtration system // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2021. – Vol. 105. – No. 19. – P. 7251–7264.
6. Kelly W., Scully J., Zhang D., Feng G., Lavengood M., Condon J., Bhatia R. Understanding and modeling alternating tangential flow filtration for perfusion cell culture // *Biotechnology Progress.* – 2014. – Vol. 30. – No. 6. – P. 1291–1300.
 7. Mandenius C. & Titchener-Hooker N. Measurement, monitoring, modelling and control of bioprocesses preface // *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology.* – 2013. – Vol. 132. – V–VII. doi: 10.1007/978-3-642-36838-7.
 8. Schram F.R., & W.D. Ian Rolfe. New euthycarcinoid arthropods from the upper Pennsylvanian of France and Illinois // *Journal of Paleontology.* – 1982. – Vol. 56. – No. 6. – P. 1434–1450.
 9. van Reis R., Gadam S., Frautschy L.N., Orlando S., Goodrich E.M., Saksena S., Kuriyel R., Simpson C.M., Pearl S., Zydney A.L. High performance tangential flow filtration // *Biotechnology and Bioengineering.* – 1997. – Vol. 56. – P. 71–82.
 10. Velez D., Miller L., & Macmillan J.D. Use of tangential flow filtration in perfusion propagation of hybridoma cells for production of monoclonal antibodies // *Biotechnol. Bioeng.* – 1989. – Vol. 33. – P. 938–940.
 11. Walther J., McLarty J., & Johnson T. The effects of alternating tangential flow (ATF) residence time, hydrodynamic stress and filtration flux on high-density perfusion cell culture // *Biotechnology and Bioengineering.* – 2019. – Vol. 116. – No. 2. – P. 320–332.
 3. Morozov A.N. Razrabotka tekhnologii perfuzionnogo kul'tivirovaniya kletok SNO dlya polucheniya monoklona'nykh antitel k immunoglobulinu E: dissertatsiya na soiskaniye uchenoy stepeni kandidata biologicheskikh nauk. Morozov Anton Nikolayevich, 2019: 162 (in Russian).
 4. BioMarin Pharmaceutical, N, United States. Automated high throughput cell culture methods for the development and investigation of large scale perfusion processes – Poster 142. Paper presented at the The 25th Annual Meeting of the European Society of Animal Cell Technology, Lausanne 2017;
 5. Hein MD, Chawla A, Cattaneo M, Kupke SY, Genzel Y, Reichl U. Cell culture-based production of defective interfering influenza A virus particles in perfusion mode using an alternating tangential flow filtration system. *Appl Microbiol Biotechnol* 2021; 105(19):7251–7264.
 6. Kelly W, Scully J, Zhang D, Feng G, Lavengood M, Condon J, Bhatia R. Understanding and modeling alternating tangential flow filtration for perfusion cell culture. *Biotechnology Progress* 2014; 30(6):1291–1300.
 7. Mandenius C & Titchener-Hooker N. Measurement, monitoring, modelling and control of bioprocesses preface. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology* 2013; 132:V–VII. doi: 10.1007/978-3-642-36838-7.
 8. Schram FR, & WD Ian Rolfe. New euthycarcinoid arthropods from the upper Pennsylvanian of France and Illinois. *Journal of Paleontology* 1982; 56(6):1434–1450.
 9. van Reis R, Gadam S, Frautschy LN, Orlando S, Goodrich EM, Saksena S, Kuriyel R, Simpson CM, Pearl S, Zydney AL. High performance tangential flow filtration. *Biotechnology and Bioengineering* 1997; 56:71–82.
 10. Velez D, Miller L, & Macmillan JD. Use of tangential flow filtration in perfusion propagation of hybridoma cells for production of monoclonal antibodies. *Biotechnol Bioeng* 1989; 33:938–940.
 11. Walther J, McLarty J, & Johnson T. The effects of alternating tangential flow (ATF) residence time, hydrodynamic stress and filtration flux on high-density perfusion cell culture. *Biotechnology and Bioengineering* 2019; 116(2):320–332.

References

1. Karpova OO, Matveyeva IN. Variant realizatsii sistemy laboratornoy ustanovki perfuzionnoy fil'tratsii dlya nepre-ryvnogo kul'tivirovaniya kul'tur kletok. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im. Yu.A. Ovchinnikova* 2023; 19(2):62–66 (in Russian).
2. Karpova OO, Matveyeva IN. Kul'tivirovaniye kletok: sravnitel'nyy analiz traditsionnykh i innovatsionnykh tekhnologiy. *Veterinarnyy vrach* 2022; 5:14–18 (in Russian).

TECHNICAL SOLUTIONS FOR CREATING A LABORATORY PERFUSION FILTRATION UNITS

O.O. SOKOL, Y. MEHDA

All-Russian Scientific Research and Technological Institute of Biological Industry, Losino-Petrovsky city, Moscow region

The review article describes in detail the technical solutions implemented in a laboratory perfusion filtration system for continuous cultivation of cell cultures. The elements of the system and their technical characteristics are considered. The above description allows you to get a general idea of the technical features of the implementation of this type of equipment for cultivation processes on a laboratory scale.

Keywords: perfusion process, perfusion filtration system, laboratory perfusion filtration system, perfusion, continuous cell cultivation, programmable logic controllers.

Address:

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

Для цитирования:

Сокол О.О., Мехда Ю. Технические решения для создания лабораторной установки перфузионной фильтрации. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(4):79–84.

For citation:

Sokol O.O., Mehda Y. Technical solutions for creating a laboratory perfusion filtration units. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(4):79–84 (in Russian).

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА С ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

А.С. ПОНАМАРЕВА*, А.Ю. ПЕТРОВ

ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург

Человек в течение всей своей жизни постоянно контактирует с различными микроорганизмами и вирусами. Вирусные инфекции всегда были достаточно опасны для человечества, являясь причиной эпидемий или пандемий. К сожалению, многие заболевания вирусного происхождения с трудом поддаются профилактике и лечению. К таким заболеваниям относят клещевой энцефалит. В статье приведен обзор лекарственных средств для профилактики и лечения клещевого энцефалита противовирусными средствами синтетического и растительного происхождения: Риамиловир (Триазавирин), Йодофеназон (Йодантипирином), Рибавирин (Рибавирин), Фавипиравир (Коронавир, Алепривир), Меглюмина акридонацетат (Циклоферон), Полисахариды побегов *Solanum tuberosum* (Панавир), 7-деаза-2-С-метиладенозин. Рассмотрены виды лекарственных форм, используемых для терапии клещевого энцефалита и их эффективность.

Ключевые слова: клещевой энцефалит, профилактика, схемы лечения, риамиловир, йодофеназон, рибавирин, фавипиравир, меглюмина акридонацетат, полисахариды побегов *Solanum tuberosum*, 7-деаза-2-С-метиладенозин, лекарственная форма.

Введение

Человек в течение всей своей жизни постоянно контактирует с различными микроорганизмами и вирусами. Если микроорганизмы можно разделить на непатогенные, условно патогенные и патогенные, то вирусы обладают выраженной патогенностью. Вирусные инфекции всегда были достаточно опасны для человечества, являясь причиной эпидемий или пандемий. До изобретения сывороток и вакцин очаги инфекций победить было невозможно, что приводило к убыли населения. В основной своей массе борьба с эпидемией приводила к победе человека над инфекцией. К сожалению, многие заболевания вирусного происхождения с трудом поддаются профилактике и лечению. К таким заболеваниям относится клещевой энцефалит. В отношении подходов к его профилактике и лечению выработано достаточно много стратегий, однако полностью победить данное заболевание пока не удалось, поэтому поиск новых и эффективных лекарственных средств остаётся актуальным. Для того чтобы определить наиболее оптимальные пути воздействия на развитие данной патологии, целесообразно рассмотреть все способы борьбы с клещевым энцефалитом.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего обзорного исследования явилось изучение подходов к профилактике и лечению клещевого энцефалита лекарственными средствами синтетического и природного происхождения.

Клещевой энцефалит — это инфекционное заболевание вирусной природы, протекающее сначала в острой, а затем переходящее в хроническую форму. Последствиями данного заболевания являются патологии неврологического характера: парезы, параличи и т.д. Передача данного заболевания осуществляется кровососущими насекомыми. К признакам заражения относят повышение температуры, нарушение координации, тошноту, рвоту, боли в мышцах и суставах. Хотя данная симптоматика не является специфичной, а характерна для любого типа вирусной инфекции [2, 3, 5].

Механизм передачи вируса клещевого энцефалита может быть одним из следующих: трансмиссивный; фекально-оральный и при непосредственном поступлении крови зараженного клещевым энцефалитом донора в организм реципиента — переливание крови, пересадка органов, трансплацентарно (внутриутробно) и др. [2, 3, 6, 10, 11].

Процесс развития клещевого энцефалита включает в себя следующие стадии: инкубационный, продромальный, лихорадочный и период реконвалесценции.

В зависимости от способа заражения и стадии развития заболевания применяют различные виды профилактики и лечения.

© 2023 г. Понамарева А.С., Петров А.Ю.

* **Автор для переписки:**

Понамарева Анна Сергеевна

аспирант кафедры фармацевтической технологии Уральского государственного медицинского университета, Екатеринбург

E-mail: Ponomareva55@mail.ru

Обзор лекарственных средств

Ввиду легкости заражения и тяжести заболевания основное внимание уделено профилактике клещевого энцефалита. Профилактика осуществляется путем вакцинации населения. Для этого используют следующие вакцины: вакцина КЭ ФГУП ПИПВЭ им. М.П. Чумакова (Москва); ЭнцеВир МГУП «Микроген» НПО «Вирион» (Томск), ФСМЕ-ИММУН (Фирма «Бакстер», Австрия) и Энцепур взрослый, Энцепур детский (фирма «Новартис Вакцины и Диагностика», Германия). На российском рынке присутствуют четыре вида вакцин, полученных по единой технологии. Различаются представленные вакцины природой вспомогательных веществ, к которым относят буферные системы, изотонирующие компоненты, наличие или отсутствие аминокислот и сахаров. Форма выпуска также едина — инъекционные растворы. Данная форма введения обладает 100%-ной биодоступностью и позволяет исключить потерю активных компонентов вакцин при прохождении через различные барьеры человеческого организма. Эффективность вакцин зависит от штамма использованного вируса и применения передовых технологий для повышения степени очистки целевого продукта от сопутствующих компонентов. Наличие или отсутствие побочных эффектов, их тяжесть и продолжительность зависят от применения современных технологий производства и степени очистки компонентов лекарственной формы. Из синтетических лекарственных средств рекомендован йодофеназон [1, 4, 5, 15, 16].

Наиболее эффективную профилактику осуществляют путём вакцинации населения, проживающего в районах с неблагоприятной эпидемиологической обстановкой. Клещевой энцефалит подлежит экстренной профилактике у лиц, подвергшихся нападению клещей при отсутствии вакцинации, применяют специфический донорский иммуноглобулин, полученный из плазмы коренных народностей, проживающих в природных очагах носителя вируса. Фармакологический эффект обусловлен высоким титром антител к вирусу. Данное лекарственное средство эффективно в первые часы после укуса насекомого. При отсутствии человеческого иммуноглобулина назначают лошадиный специфический гетерологический.

Для лечения клещевого энцефалита предлагаются лекарственные препараты различных фармакологических групп. При этом клинические рекомендации [5] классифицируют виды лечения с учетом стадии заболевания, различая формы клещевого вирусного энцефалита как: лихорадочную, менингеальную и менингоэнцефалити-

ческую — полиоэнцефалитическую — полиомиелитическую — полиоэнцефаломиелитическую.

При рассмотрении подходов к лечению следует отметить, что основу составляет иммунотерапия: иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита, используемый при первых двух формах и противоклещевая иммунная плазма, используемая при формах 2 и 3.

Стандарты лечения, принятые в Российской Федерации, включают в себя следующие виды медикаментозной терапии:

- Этиотропное, которое направлено непосредственно на причину заболевания и включает в себя применение специфического противоклещевого иммуноглобулина, а при ранней диагностике рекомендовано применение интерферона (Реаферон-ЕС-липид) и индукторов интерферона (Меглюмина акридонацетат).

- Патогенетическое лечение, которое корректирует патологические процессы, индуцированные попаданием вируса в организм. Стандарт рекомендует следующую тактику лечения: проведение дезинтоксикации с последующим восполнением объёма циркулирующей крови за счет инфузионной терапии; для профилактики отека головного мозга — дегидратационная терапия; купирование лихорадки следует проводить с использованием нестероидных противовоспалительных препаратов; при появлении симптомов отека головного мозга и для купирования инфекционно-токсического шока — назначение глюкокортикоидов; предупреждение и лечение инфекционных и(или) септических осложнений за счет применения антибиотикотерапии; назначение антикоагулянтов, противосудорожных препаратов, антиоксидантная терапия, средства для наркоза; в ранний восстановительный период рекомендовано назначение ноотропных препаратов.

При всех трёх формах используют витаминные лекарственные средства, оказывающие преимущественное влияние на нервную систему (тиамин и пиридоксин), а также природный антиоксидант аскорбиновую кислоту. Ввиду того, что вирус клещевого энцефалита оказывает влияние на нервно-мышечную передачу и баланс электролитов, вне зависимости от форм заболевания, рекомендовано включить в терапевтическую схему смесь калия хлорида, натрия ацетата и натрия хлорида. На всех этапах лечения рекомендованы растворы с осмодиуретическим действием и сульфонамиды. Поскольку заболевание сопровождается мышечными болями и повышенной температурой, рекомендованы местные анестетики (прокаин) и нестероидные противовоспалительные препараты (диклофенак, кетопрофен), а также парацетамол и мета-

мизол натрия. Активизация воспалительных процессов требует применения глюкокортикоидов. При переходе заболевания в третью стадию и обострении болевого синдрома к общей схеме лечения добавляют средства общей анестезии (пропофол, кетамин, дроперидол) и группы опиоидов (трамадол).

Бессменным спутником вирусной инфекции является микробная; поэтому начиная со второй фазы в рекомендованную схему лечения включены антибиотики группы цефалоспоринов третьего и четвертого поколения, карбапенемы, аминогликозиды, фторхинолоны, антибиотики гликопептидной структуры. Особенность клещевого энцефалита состоит в том, что органом-мишенью является нервная система человека; поэтому в схему лечения на всех стадиях включена смесь инозина, никотинамида, рибофлавина и янтарной кислоты; отдельно рекомендовано использовать синтетический антиоксидант этилметилгидроксипиридина сукцинат, а также психостимуляторы и ноотропы (пирацетам и глицин). Вторая и третья фазы развития заболевания требуют применения средств воздействия на нервную систему группы барбитуратов, производных бензодиазепина и карбоксиамида [1, 4, 15, 16].

Особо обращает на себя внимание, что только меглюмина акридоацетат, лекарственное средство синтетического происхождения, включен в актуальный стандарт лечения в Российской Федерации, тогда как зарубежные литературные источники содержат информацию о том, что специфическая медикаментозная противовирусная терапия отсутствует [2, 18, 20, 21], хотя активная работа в этом направлении не прекращается.

Меглюмина акридоацетат — синтетическое лекарственное средство с иммуномодулирующей активностью по химической структуре представляет собой ацилированное производное акридина в сочетании с многоатомным аминоксиритом метилглюкаминном [13]. Данная комбинация интересна в плане сочетания фармакологической активности, так как структура акридина входит в состав лекарственных средств, обладающих противоопухолевой, противомаларийной, противотуберкулезной, противовирусной, антибактериальной и антиацетилхолинэстеразной активностью. Метилглюкамин в соответствии с регистром лекарственных средств относится к группе детоксицирующих.

Из протестированных на наличие противовирусной активности лекарственных средств следует отметить следующие противовирусные препараты. *Синтетические лекарственные средства, зарегистрированные в Российской Федерации:*

1. *Риамиловир*. По химической структуре он представляет собой аналог гуанина, механизм действия заключается в блокаде синтеза вирусной РНК, препарат также тормозит репликацию геномных фрагментов, мишенью является фермент протеин-дисульфид-изомераза; таким образом, целью препарата являются свободные меркапто-группы белковой структуры вируса. В результате проведенной терапии риамиловир купировал симптоматическое проявление вирусного заболевания: катаральные явления, значительно снижал интенсивность мышечных болей, исчезали признаки воспалительного процесса (лихорадка и головная боль) (табл. 1) [14].

2. *Йодофеназон*. Является производным пиразола. Результаты экспериментальных исследований показали наличие у йодофеназона иммуномодулирующих свойств. Являясь индуктором интерферона, он не оказывает угнетающего воздействия на гуморальный иммунитет. Данный лекарственный препарат может быть использован для целей экстренной профилактики клещевого энцефалита. Эффективен в отношении лихорадочной формы клещевого энцефалита, его действие сопоставимо с таковым для специфического иммуноглобулина (см. табл. 1) [8].

3. *Рибавирин*. По химической структуре является производным гуанина. В экспериментальных исследованиях обнаружил высокую противовирусную активность, он полностью ингибировал продукцию вируса. В эксперименте на мышцах рибавирин снижал смертность экспериментальных животных до 5% (см. табл. 1) [7].

4. *Фавипиравир*. Лекарственное средство показало эффективность на стадии тяжелого менингоэнцефалита. В результате противовирусной терапии фавипиравиром было достигнуто полное выздоровление при отсутствии побочных эффектов. Курс лечения составил 8 дней (см. табл. 1) [17].

Лекарственные средства природного происхождения, зарегистрированные в Российской Федерации:

Полисахариды побегов Solanum tuberosum. Основу химической структуры данного лекарственного средства составляет полисахарид. Именно за счет структурных особенностей препарат продемонстрировал эффективность при менингеальной форме. Через месяц после начала лечения у пациентов регистрировали исчезновение антигена к вирусу, значительно сокращался лихорадочный период (см. табл. 1) [9].

Изыскание новых противовирусных средств в отношении возбудителя клещевого энцефалита отечественными учеными ведется более активно, чем за рубежом, поскольку ареал обитания носителя данного заболева-

ния в основном находится на территории Российской Федерации, хотя в литературе имеются сведения об исследовании 7-деаза-2-С-метиладенозина на наличие специфической противовирусной активности. Экспери-

менты выполнены на лабораторных мышах, при этом испытуемый образец в дозе 25 мг/кг массы лабораторного животного при введении два раза в сутки полностью тормозил репликацию вируса (см. табл. 1) [19].

Таблица 1

Схемы профилактики и лечения противовирусными препаратами

Наименование лекарственного средства	Профилактика	Лечение
Меглюмина акридоацетат		Таблетированная лекарственная форма. Инъекционный раствор
Полисахариды побегов <i>Solanum tuberosum</i>	Данные отсутствуют	Внутривенное трехкратное введение через 18 часов 0,004% изотонического раствора в объеме 5 мл
Риамиловир	Данные отсутствуют	Лекарственное средство в виде капсулированной лекарственной формы 250 мг перорально 5 раз в день в течение 5 дней
Йодофеназон	Курс приема составляет 7 дней, затем повтор курса после трехдневного перерыва. Лекарственное средство в виде таблетированной лекарственной формы по 100 мг. При экстренной профилактике курс составляет 9 дней, в соответствии со схемой, общее количество принятого лекарственного средства составляет 4,5 г: первый и второй день — по 0,3 г 3 раза в день; третий и четвертый день — по 0,2 г 3 раза в день; последующие пять дней — по 0,1 г три раза в день	В сочетании с иммуноглобулином курс составляет 9 дней, в соответствии со схемой, общее количество принятого лекарственного средства составляет 4,5 г: первый и второй день — по 0,3 г 3 раза в день; третий и четвертый день — по 0,2 г 3 раза в день; последующие пять дней — по 0,1 г три раза в день
Рибавирин	Данные отсутствуют	Лекарственная форма — капсулы 0,2 г. Доза рассчитывается в зависимости от массы пациента. Прием препарата осуществляется два раза в сутки, утром и вечером двумя одинаковыми дозами, или вечерняя доза выше утренней В эксперименте минимальная эффективная концентрация составляет 31 мкг/мл
Фавипиравир	Данные отсутствуют	1600 мг два раза в день в течение первых суток, затем по 600 мг два раза в день в течение 7 дней
Экстракт <i>Terminalia chebula</i> Retz. (Combretaceae) (хебулиевая кислота и пуникалагин)	Данные отсутствуют	Условия эксперимента

Растительные компоненты также могут являться основой для создания лекарственных средств, проявляющих активность в отношении клещевого энцефалита. Комплексные экспериментальные исследования российских и монгольских учёных продемонстрировали эффективность экстракта *Terminalia chebula* Retz. (Combretaceae) в отношении вируса клещевого энцефалита. Предположительно, наблюдавшаяся активность связана с присутствием в экстракте хебулиевой кислоты и пуникалагина [12].

Из рассмотренных выше лекарственных средств для лечения клещевого энцефалита рекомендован меглюмина акридоацетат, а для профилактики — йодофеназон, тогда как для непосредственного лечения он может быть использован только в комбинации с иммуноглобулином. Препараты, используемые для терапии клещевого энцефалита, применяют как в виде твердых лекарственных форм (риамиловир, рибавирин, фавипиравир), так и в виде инъекционного раствора (полисахариды побегов *Solanum tuberosum*), что говорит о недостаточной из-

ученности влияния способа введения лекарственного средства на результаты лечения заболевания.

Заключение

Исходя из вышеизложенного, можно прийти к заключению, что в отношении вируса клещевого энцефалита существуют различные подходы к лечению в соответствии с отечественными и зарубежными стандартами. В первом случае официально для лечения рекомендован меглюмина акридонацетат, а для профилактики — йодофеназон, тогда как зарубежные литературные источники утверждают, что синтетических противовирусных лекарственных препаратов для лечения клещевого энцефалита нет. При этом большую роль играет именно профилактика заболевания, так как его последствия достаточно травматичны и необратимы для человеческого организма.

Литература

1. Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сорбированная, ЭнцеВир®. Режим доступа: <https://www.microgen.ru/products/vaktsiny/vaktsina-kleshchevogo-entsefalita-kulturalnaya-ochishchennaya-kontsentrirrovannaya-inaktivirovannaya> (дата обращения: 31.10.2023).
2. Всемирная организация здравоохранения. Клещевой энцефалит. Информационный бюллетень, июнь 2014. Режим доступа: <https://www.euro.who.int/ru/media-centre/sections/fact-sheets/2014/03/fact-sheets-world-health-day-2014-vector-borne-diseases/fact-sheet-tick-borne-encephalitis-in-europe> (дата обращения: 07.02.2022).
3. Злобин В.И., Горин О.З. Клещевой энцефалит. Этиология, эпидемиология и профилактика в Сибири. — Новосибирск: Наука, 1996. — 177 с.
4. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Клещ-Э-Вак (Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сорбированная). Регистрационный номер ЛП-001584.
5. Клинические рекомендации. Клещевой вирусный энцефалит. Режим доступа: https://edu.nmrc.ru/wp-content/uploads/2022/04/kr_kleshchevoy_encefalit.pdf.
6. Конькова-Рейдман А.Б. Клещевые нейроинфекции: клиническая характеристика, иммунопатогенез и новые фармакотерапевтические стратегии // Терапевтический архив. — 2016. — Т. 88. — № 11. — С. 55–61.
7. Крылова Н.В., Леонова Г.Н. Противовирусная активность препаратов с различным механизмом действия при экспериментальном клещевом энцефалите // Вопросы вирусологии. — 2016. — Т. 61. — № 3. — С. 139–144.
8. Лепехин А.В., Ильинских Е.Н., Лукашова Л.В. и др. Новые подходы к экстренной профилактике и лечению вирусных инфекций на примере клещевого энцефалита и гриппа // Медицинский совет. — 2016. — № 4. — С. 82–87.
9. Лепехин А.В., Ратникова Л.И., Литвин А.А. [и др.]. Опыт применения Панавира в терапии клещевого энцефалита // Инфекционные болезни. — 2007. — Т. 5. — № 1. — С. 41–46.
10. Профилактика клещевого вирусного энцефалита. Санитарно-эпидемиологические правила. СП 3.1.3.2352-08. — Москва, 2008.
11. Семенов В.А. Клещевые нейроинфекции. — М.: Медицина, 2004. — 104 с.
12. Соловаров И.С., Хаснатинов М.А., Ляпунов А.В. [и др.]. Антивирусная активность экстрактов трав против вируса клещевого энцефалита (обзор литературы) // Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal). — 2017. — Т. 2. — № 5–1(117). — С. 93–99.
13. Сологуб Т.В., Шульдяков А.А., Романцов М.Г., Жекалов А.Н., Петленко С.В., Ерофеева М.К., Максакова В.Л., Исаков В.А., Зарубаев В.В., Гацан В.В., Коваленко А.А. Циклоферон как средство лечения и экстренной профилактики гриппа и ОРВИ (многоцентровое рандомизированное контрольно-сравнительное исследование) // Антибиотики и Химиотерапия. — 2009. — Т. 54. — № 7–8. — С. 30–36.
14. Тихонова Е.П., Кузьмина Т.Ю., Анисимова А.А., Калинин Ю.С. О возможности применения триазавирина в комплексном лечении клещевого вирусного энцефалита у взрослых // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2018. — Т. 81. — № 9. — С. 21–25.
15. Фсме-Иммун Джуниор (Fsme-Immun Junior). Инструкция по применению. Режим доступа: https://www.vidal.ru/drugs/fsme-immun_junior_16808. (дата обращения: 31.10.2023).
16. Энцепур взрослый (Вакцина против клещевого энцефалита инактивированная очищенная с адьювантом) (Encepur® adults). Режим доступа: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_94022.htm. (дата обращения: 31.10.2023).
17. Bologheanu R., Schubert L., Thurnher M., et al. Unexpected complete recovery of a patient with severe tick-borne encephalitis treated with favipiravir // Antiviral research. — 2020. — Vol. 184. — Art. 104952. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104952.
18. Dobler G., Kaier K., Hehn P., Böhmer M.M., Kreusch T.M., Borde J.P. Tick-borne encephalitis virus vaccination breakthrough infections in Germany: a retrospective analysis from 2001 to 2018 // Clin. Microbiol. Infect. — 2020. — Vol. 26. — No. 8. — P. 1090.E7–1090.E13. doi: 10.1016/j.cmi.2019.12.001.

19. Eyer L., Fojtíková M., Nencka R., Rudolf I., Hubálek Z., Ruzek D. Viral RNA-dependent RNA polymerase inhibitor 7-deaza-2'-C-methyladenosine prevents death in a mouse model of West Nile virus infection // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 2019. — Vol. 63. — No. 3. — P. e02093–18. doi: 10.1128/AAC.02093-18.
20. Mickiene A., Laiskonis A., Günther G., Vene S., Lundkvist A., Lindquist L. Tickborne encephalitis in an area of high endemicity in Lithuania: disease severity and long-term prognosis // *Clin Infect Dis*. — 2002. — Vol. 35. — No. 6. — P. 650–658.
21. Steffen R. Tick-borne Encephalitis — need to know for professionals outside endemic areas // *Dr. Sulaiman Al Habib Medical Journal*. — 2019. — Vol. 1. — Issue 3–4. — P. 65–69.
9. Lepekhin AV, Ratnikova LI, Litvin AA i dr. Opyt primeneniya Panavira v terapii kleshchevogo entsefalita. *Infektsionnye bolezni* 2007; 5(1):41–46 (in Russian).
10. Profilaktika kleshchevogo virusnogo entsefalita. Sanitarno-epidemiologicheskiye pravila. SP 3.1.3.2352-08. Moscow, 2008 (in Russian).
11. Semenov VA. Kleshchevyey neyroinfektsii. Moscow: Medicina, 2004: 104 (in Russian).
12. Solovarov IS, Khasnatinov MA, Lyapunov AV i dr. Antivirusnaya aktivnost' ekstraktov trav protiv virusa kleshchevogo entsefalita (obzor literatury). *Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal)* 2017; 2(5–1):93–99 (in Russian).
13. Sologub TV, Shul'dyakov AA, Romantsov MG, Zhekalov AN, Petlenko SV, Yerofeyeva MK, Maksakova VL, Isakov VA, Zarubayev VV, Gatsan VV, Kovalenko AL. Tsikloferon kak sredstvo lecheniya i ekstremnoy profilaktiki gripa i ORVI (mnogotsentrovoye randomizirovannoye kontrol'no-sravnitel'noye issledovaniye). *Antibiotiki i Khimioterapiya* 2009; 54(7–8):30–36 (in Russian).
14. Tikhonova YeP, Kuz'mina TYu, Anisimova AA, Kalinina YuS. O vozmozhnosti primeneniya triazavirina v kompleksnom lechenii kleshchevogo virusnogo entsefalita u vzroslykh. *Ekspirimental'naya i klinicheskaya farmakologiya* 2018; 81(9):21–25 (in Russian).
15. Fsme-Immun Dzhunior (Fsme-Immun Junior). Instruksiya po primeneniyu. URL: https://www.vidal.ru/drugs/fsme-immun_junior_16808. (data of access: 31.10.2023) (in Russian).
16. Entsepur vzroslyy (Vaktsina protiv kleshchevogo entsefalita inaktivirovannaya ochishchennaya s ad'yuvantom) (Encepur® adults). URL: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_94022.htm. (data of access: 31.10.2023) (in Russian).
17. Bologheanu R, Schubert L, Thurnher M, et al. Unexpected complete recovery of a patient with severe tick-borne encephalitis treated with favipiravir. *Antiviral research* 2020; 184:104952. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104952.
18. Dobler G, Kaier K, Hehn P, Böhmer MM, Kreuzsch TM, Borde JP. Tick-borne encephalitis virus vaccination breakthrough infections in Germany: a retrospective analysis from 2001 to 2018. *Clin Microbiol Infect* 2020; 26(8):1090.E7–1090.E13. doi: 10.1016/j.cmi.2019.12.001.
19. Eyer L, Fojtíková M, Nencka R, Rudolf I, Hubálek Z, Ruzek D. Viral RNA-dependent RNA polymerase inhibitor 7-deaza-2'-C-methyladenosine prevents death in a mouse model of West Nile virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2019; 63(3):e02093–18. doi: 10.1128/AAC.02093-18.
20. Mickiene A, Laiskonis A, Günther G, Vene S, Lundkvist A, Lindquist L. Tickborne encephalitis in an area of high endemicity in Lithuania: disease severity and long-term prognosis. *Clin Infect Dis* 2002; 35(6):650–658.
21. Steffen R. Tick-borne Encephalitis — need to know for professionals outside endemic areas. *Dr Sulaiman Al Habib Medical Journal* 2019; 1(3)–4. — P. 65–69.

References

1. Vaktsina kleshchevogo entsefalita kul'tural'naya ochishchennaya kontsentrirovannaya inaktivirovannaya sorbirovannaya, EntseVir®. URL: <https://www.microgen.ru/products/vaktsiny/vaktsina-kleshchevogo-entsefalita-kulturalnaya-ochishchennaya-kontsentrirovannaya-inaktivirovannaya> (data of acces: 31.10.2023) (in Russian).
2. Vsemirnaya organizatsiya zdavookhraneniya. Kleshchevoy entsefalit. Informatsionnyy byulleten', iyun' 2014. URL: <https://www.euro.who.int/ru/media-centre/sections/fact-sheets/2014/03/fact-sheets-world-health-day-2014-vector-borne-diseases/fact-sheet-tick-borne-encephalitis-in-europe> (data of access: 07.02.2022) (in Russian).
3. Zlobin VI, Gorin OZ. Kleshchevoy entsefalit. Etiologiya, epidemiologiya i profilaktika v Sibiri. Novosibirsk: Nauka, 1996: 177 (in Russian).
4. Instruksiya po primeneniyu lekarstvennogo preparata dlya meditsinskogo primeneniya Kleshch-E-Vak (Vaktsina kleshchevogo entsefalita kul'tural'naya ochishchennaya kontsentrirovannaya inaktivirovannaya sorbirovannaya). Registratsionnyy nomer LP-001584 (in Russian).
5. Klinicheskiye rekomendatsii. Kleshchevoy virusnyy entsefalit. URL: https://edu.nmrc.ru/wp-content/uploads/2022/04/kr._kleshchevoy_encefalit.pdf (in Russian).
6. Kon'kova-Reydmann AB. Kleshchevyey neyroinfektsii: klinicheskaya kharakteristika, immunopatogenez i novyye farmakoterapevticheskiye strategii. *Terapevticheskiy arkhiv* 2016; 88(11):55–61 (in Russian).
7. Krylova NV, Leonova GN. Protivovirusnaya aktivnost' preparatov s razlichnym mekhanizmom deystviya pri eksperimental'nom kleshchevom entsefalite. *Voprosy virusologii* 2016; 61(3):139–144 (in Russian).
8. Lepekhin AV, Il'inskikh YeN, Lukashova LV i dr. Novyye podkhody k ekstremnoy profilaktike i lecheniyu virusnykh infektsiy na primere kleshchevogo entsefalita i gripa. *Meditsinskiy sovet* 2016; 4:82–87 (in Russian).

MEDICINES WITH ANTIVIRAL ACTIVITY IN THE PREVENTION AND TREATMENT OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS

A.S. PONAMAREVA, A.Yu. PETROV

Ural State Medical University

A person is constantly in contact with various microorganisms and viruses throughout his life. Viral infections have always been quite dangerous for humanity, being the cause of epidemics or pandemics. Unfortunately, many diseases of viral origin are difficult to prevent and treat. Such diseases include tick-borne encephalitis. The present article provides an overview of medicines for the prevention and treatment of tick-borne encephalitis with antiviral agents of synthetic and plant origin: Riamilovir (Triazavirin), Iodophenazone (Iodantipirin), Ribavirin (Ribavirin), Favipiravir (Coronavir, Aleprivir), Megluminacridone acetate (Cycloferon), Polysaccharides of *Solanum tuberosum* shoots (Panavir), 7-deaza-2-C-methyladenosine. The types of dosage forms used for the treatment of tick-borne encephalitis and their effectiveness are considered.

Keywords: tick-borne encephalitis, prevention, treatment regimens of amilovir, iodophenazone, ribavirin, favipiravir, megluminacridone acetate, polysaccharides of *Solanum tuberosum* shoots, 7-dease-2-C-methyladenosine, dosage form.

Address:

Ponomareva Anna Sergeevna
postgraduate student of the department of pharmaceutical
technology, Ural State Medical University
E-mail: Ponomareva55@mail.ru

Для цитирования:

Понамарева А.С., Петров А.Ю. Лекарственные средства с противовирусной активностью в профилактике и лечении клещевого энцефалита. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2023; 19(4):85–91.

For citation:

Ponomareva A.S., Petrov A.Yu. Medicines with antiviral activity in the prevention and treatment of tick-borne encephalitis. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2023; 19(4):85–91 (in Russian).

ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Д.А. КИРИЛЛОВА^{1*}, П.М. ГОТОВЦЕВ^{1,2}, Р.Г. ВАСИЛОВ¹

¹ *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»*,

² *Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Москва*

Электропроводящие полимеры, такие как полианилин, полипиррол и поли(3,4-этилендиокситиофен) с хорошей биосовместимостью, находят широкое применение в биомедицине, включая биосенсоры, нейронные импланты и тканевую инженерию. Этот обзор посвящен проводящим полимерам для применения в тканевой инженерии. Электропроводящие полимеры хорошо себя показали в качестве матриц для регенерации тканей, а их способность к электропроводимости позволяет стимулировать культивируемые на них клетки электрическими сигналами. Однако механическая хрупкость таких материалов ограничивает их применение. В связи с этим были разработаны проводящие полимерные композиты на основе проводящих полимеров. Основная цель настоящего обзора — обобщить данные об электропроводящих материалах для медицинских применений, включая проводящие гидрогели и проводящие композитные пористые матрицы, используемые в инженерии костной, мышечной, сердечной и нервной тканей.

Ключевые слова: тканевая инженерия; электропроводящие полимеры; полимерные матрицы; клеточные культуры; биоинженерия.

Введение

Тканевая инженерия в настоящий момент является активно развивающимся направлением в биомедицинской науке. Клеточный материал, полученный посредством биопсии, выращивают и культивируют в виде монослоя в чаше Петри [16]. Затем выращенные клетки переносят и культивируют в трехмерной структуре, изготовленной из биосовместимого полимера, для прикрепления и размножения клеток. После создания полностью функционального органа его переносят в тело пациента.

Матрицы должны быть изготовлены из биосовместимого и нетоксичного материала. Клетки должны иметь возможность прикрепляться, расти, делиться, а также восстанавливаться до и после имплантации на всей поверхности полимера. Полимерные матрицы должны быть разлагаемыми, а их продукты не должны вызывать отрицательной реакции иммунной системы. Они также должны иметь высокую пористость и структуру взаимосвязанных пор, которые обеспечивают снабжение клеток питательными веществами [38].

Электропроводящие полимерные материалы

Несколько различных полимеров, включая полимолочную кислоту (PLA), полигликолевую кислоту (PGA) и поликапролактон (PCL), уже были исследованы в области тканевой инженерии. PCL представляет собой полимер каучукового типа, который теряет свою целостность через несколько лет, что особенно не подходит для регенерации тканей. PGA используется в различных клинических случаях, однако срок службы этого материала в человеческом теле не больше месяца (приблизительно). PLA является идеальным полимером для использования в различных операциях по лечению ран и фиксации костей, так как она разлагается от нескольких месяцев до года (что может быть вызвано ее гидрофобностью). PLA представляет собой биосовместимый, биоразлагаемый и иммунологически инертный синтетический полимер [51].

Проводящие или сопряженные полимеры также нашли широкое применение во многих областях, включая фотоэлектрику, оптоэлектронику, биосенсоры и регенеративную медицину [6, 35]. Среди таких материалов полипиррол (PPy), полианилин (PANi) и поли(3,4-этилендиокситиофен) (PEDOT) используются в качестве электроактивных субстратов. Однако из-за небольшой собственной проводимости применяется процесс легирования для превращения этих материалов в проводники. Контроль размера, заряда и стабильности

© 2023 г. Кириллова Д.А., Готовцев П.М., Васильев Р.Г.

* **Автор для переписки:**

Кириллова Дарья Александровна

аспирант, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

E-mail: d-kirillova@mail.ru

противоионов имеет первостепенное значение для настройки электрохимических свойств таких материалов. Иonomерная смесь PEDOT:PSS представляет особый интерес благодаря ее стабильности, цитосовместимости и проводимости [21, 39]. Основные свойства данных полимеров представлены в таблице 1. В настоящей статье будут рассмотрены композиты на основе PEDOT и их применение в тканевой инженерии.

Таблица 1

Электропроводимость и свойства проводящих полимеров

Полимер	Проводимость (S/cm)	Свойства	Ссылка
PPy	2000	Высокая электропроводность, простота изготовления и модификации поверхности	[9, 42, 58]
PANI	112	Различные структурные формы могут легко переходить одна в другую, низкая стоимость	[44, 22]
PEDOT:PSS	4700	Высокая электропроводность, электрохимическая стабильность, оптическая прозрачность	[53, 56]

Согласно второму закону Нернста, существует связь между потенциалом клеточной мембраны и концентрацией ионов внутри и снаружи клетки. Любое изменение этой концентрации может повлиять на напряжение клетки и поведение в состоянии покоя [8, 43]. Клеточная мембрана зависит от напряжения, и было доказано, что любое изменение в биполярной мембране клетки влияет на открытие или закрытие клеточных каналов. Следовательно, такое изменение может влиять на перенос ионов между внутренней и внешней частью клеток [24]. Изменения потенциала клеточных мембран создают ток между клеточными мембранами. Этот ток создает электрическое поле, которое воздействует на другие клетки, а также вызывает изменения в их мембранах [24]. Таким образом, согласно научным исследованиям, указанный мембранный ток изменяется при применении внешней электрической стимуляции.

Поли(3,4-этилендиокситиофен): поли(стиролсульфонат) (PEDOT:PSS) является одним из наиболее перспективных проводящих полимеров с точки зрения практического применения. Он обладает многими уникальными свойствами, такими как хорошая способность к образованию пленок благодаря универсальным

технологиям изготовления, превосходная оптическая прозрачность в видимом диапазоне света, высокая электропроводность и хорошая физическая и химическая стабильность на воздухе. PEDOT:PSS имеет широкое применение в устройствах преобразования и хранения энергии. В обзоре [50] описано его использование в качестве органических солнечных элементов, в сенсibilizированных красителями солнечных батареях — ячейках Гретцеля, суперконденсаторах, топливных элементах, термоэлектрических устройствах. Также PEDOT:PSS является потенциальным кандидатом на биомедицинское применение, и было высказано предположение, что он представляет собой идеальный матрикс для роста и электрической стимуляции различных типов клеток, в первую очередь, остеогенных клеток [47], а также нейрональных клеток-предшественников [18, 28, 40, 49].

Проводящие полимеры на основе PEDOT стимулируют адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток [15, 18, 20, 28]. Была исследована дифференцировка нейральных стволовых клеток путем применения низковольтных стимуляций [39, 48, 49]. Работы *in vitro*, изучающие эффекты PEDOT:PSS по нейральной дифференцировке, были проведены на клетках различных источников, таких как трансформированные линии нейронов (дифференцированные клетки SH-SY5Y — сходны с первичными нейронами с длинными отростками; повышенная экспрессия нейрон-специфических маркеров [41]) или мезенхимные стволовые клетки, которые могут не полностью отражать свойства нервных тканей — дифференцируются в клетки костной, хрящевой и жировой тканей) [13]. PEDOT:PSS биосовместимые гидрогели характеризуются улучшенным прикреплением и жизнеспособностью клеток [36, 45] и сниженной реакцией на инородное тело [11, 25, 27]. Такие композиты являются и подходящими структурами для создания трехмерных клеточных культур благодаря их мягкой тканеподобной природе [19].

Тканевая инженерия все чаще рассматривается для восстановления несросшихся фракций, черепно-лицевой реконструкции или замещения крупных костных дефектов проводящими губчатыми материалами. В [37] показано, что внешняя электрическая стимуляция способствует заживлению костей как в экспериментах на животных, так и в клинических исследованиях. Кроме того, доклинические и клинические исследования показали превосходное заживление дефектов хряща при применении электрического тока к мезенхимальным стволовым клеткам [4, 5]. В 1957 году Фукада и Ясуда сообщили, что костям присущи пьезоэлектрические

свойства, предполагая, что электрическая стимуляция будет способствовать сращению несросшихся переломов костей или увеличению скорости заживления [2, 12]. Также появляется все больше доказательств того, что внешняя электрическая стимуляция влияет на пролиферацию, миграцию и биологическую минерализацию клеток [14, 32]. Проводящие матриксы на основе сопряженных полимеров представляют наибольший интерес для сохранения пьезоэлектрических свойств костной ткани и индукции остеогенеза при имплантации [17, 52].

В работе [54] описывается изготовление трехмерных макропористых матриксов на основе PEDOT:PSS по технологии freeze casting. Матрицы имеют регулируемый размер пор и морфологию, а также являются электрохимически активными. При приложении потенциала происходят обратимые изменения в их электрическом легирующем состоянии, что, в свою очередь, позволяет точно контролировать конформацию адсорбированных белков. Кроме того, матриксы поддерживают рост фибробластов мыши (3T3-L1) в течение 7 дней и способны электрически контролировать клеточную адгезию и проангиогенную способность, что говорит о потенциальном применении материалов в тканевой инженерии и регенеративной медицине. Создание матриксов с высокой взаимосвязанностью пор и диаметром пор более 100 мкм представляет большой интерес во многих подходах к тканевой инженерии, а также существует общее мнение, что такие поры (более 100 мкм) способствуют усиленному прикреплению и детерминизации клеток [26, 33], а также формированию трехмерных тканей [3, 34].

Во время остеогенной дифференцировки клетки проходят разные стадии и достигают зрелого фенотипа после минерализации внеклеточного матрикса и образования костных узелков из гидроксиапатита. Минерализация трехмерного материала может выступать в качестве жизненно важной поддержки для инициации нуклеации и дальнейшего запуска остеогенной дифференцировки и минерализации внеклеточного матрикса. Также было показано, что гибридные матрицы PEDOT:PSS, содержащие биоактивные стекла и желатин, минерализуются после длительной инкубации в искусственной жидкости организма (SBF) и, как сообщается, являются мощными материалами, индуцирующими биоминерализацию *in vitro* [59]. Считается, что зарождение минерализации или образование гидроксиапатита инициируется первоначальным накоплением кальция. Таким образом, способность накапливать кальций является многообещающим шагом на пути к возможной минерализации трехмерного матрикса [31] (то есть будет способствовать зародышео-

бразованию кристаллов и минерализации ЕСМ клеток-предшественников остеобластов).

В исследовании [15] матриксы PEDOT:PSS были разработаны и протестированы *in vitro* с использованием остеогенных клеток-предшественников MC3T3-E1, а клетки оценивались на предмет различных стадий дифференцировки и проявления остеогенного фенотипа. Высокопористые проводящие матриксы на основе PEDOT:PSS подходят в качестве каркаса для инженерии костной ткани, о чем свидетельствует дифференцировка остеогенных клеток-предшественников (MC3T3-E1) в остеобласты.

В работе [60] представлены разработанные пастообразные проводящие полимерные чернила на основе криогенного замораживания водного раствора PEDOT:PSS с последующей лиофилизацией и контролируемым повторным диспергированием в смеси воды и диметилсульфоксида (ДМСО), подходящие для 3D печати из высококонцентрированного раствора нанопибрилл PEDOT:PSS за счет образования переплетений между нанопибриллами. Полученные чернила из проводящего полимера демонстрируют превосходные возможности для 3D-печати с высоким разрешением (более 30 мкм). Сухой отжиг проводящих полимеров позволяет получить высокопроводящие и гибкие 3D-микроструктуры PEDOT:PSS в сухом состоянии. Более того, сухой напечатанный на 3D-принтере проводящий полимер можно легко преобразовать в мягкий, но обладающий высокой проводимостью, путем последующего набухания во влажной среде.

Электрическая стимуляция определенных областей мозга *in vivo*, например, глубокая стимуляция мозга (DBS) является мощным методом для облегчения двигательных расстройств у пациентов, которые больше не реагируют на фармакологическое лечение [23]. Это требует имплантации массива электродов в определенные области мозга для доставки электрических импульсов. Их можно использовать для блокирования аномальной нервной активности, связанной с болезнью Паркинсона, и для нормализации гомеостаза клеток [7].

В статье [10] показан синтез проводящего PEDOT и биосовместимого PLA полимеров, который можно печатать на 3D-принтере. Поли(3,4-этилендиокситиофен) (PEDOT) нерастворим, а PLA является наиболее популярным и биосовместимым полимером, который обычно печатается на 3D-принтере. PLA в сочетании с PEDOT позволяет создать материал для 3D-печати, обладающий электронной проводимостью и биосовместимостью. Сополимеры PEDOT-g-PLA синтезируют-

ются путем химической окислительной полимеризации между 3,4-этилендиокситиофеном и макромономерами PLA. Авторы показали, что полимер PEDOT-g-PLA демонстрирует превосходный рост клеток и созревание сердечных миоцитов, совместно культивируемых с фибробластами.

В таблице 2 представлены основные типы композитных материалов на основе PEDOT, которые используются для клеточной инженерии. Как видно из этой таблицы, данный полимер рассматривается как крайне перспективный для инженерии мышечных и костных тканей.

Таблица 2

Разновидности композитных материалов на основе PEDOT

Тип материала на основе PEDOT	Характеристики	Предполагаемое назначение	Ссылки
Гель на основе PEDOT:PSS	PEDOT:PSS, желатин и альгинат, метод solvent-casting (метод прямой адсорбции).	клетки сосудистого эндотелия (HUVEC)	[29]
Матрикс на основе PEDOT	PCL-PEDOT с добавлением многостенных углеродных нанотрубок (MWCNT). Метод электроформования	Инженерия ткани скелетных мышц	[30]
Гель на основе PEDOT	PEDOT, GelMA (метакрилоил желатина). Метод 3D биопечати	Инженерия мышечной ткани	[55]
Микростолбики (микрокапиллярные электроды) на основе PEDOT:PSS	PEDOT:PSS, диметилсульфоксид, (3-глицидилоксипропил)триметоксисилан (GOPS). Метод 3D биопечати	Инженерия мышечной ткани сердца	[57]
Пористые нановолоконные матриксы на основе PEDOT:PSS	PEDOT:PSS, хитозан, поливиниловый спирт (PVA). Метод электроформования	Инженерия сердечной ткани	[1]
3D пористые матриксы на основе PEDOT:PSS	PEDOT:PSS, диметилсульфоксид, (3-глицидилоксипропил)триметоксисилан (GOPS). Метод freeze casting (метод замораживающего литья)	Инженерия костной ткани	[54]
3D пористые матриксы на основе PEDOT:PSS	PEDOT:PSS, 4-додецилбензолсульфоновая кислота (DBSA), (3-глицидилоксипропил)триметоксисилан (GOPS). Метод freeze casting (метод замораживающего литья)	Инженерия костной ткани	[15]
3D пористые матриксы на основе PEDOT:PSS	PEDOT:PSS, коллаген I типа (COLL1)	Инженерия костной ткани	[18]
Гель gel:HA:PEDOT-NPs	наночастицы PEDOT (PEDOT NPs), желатин, гиалуроновая кислота (HA). Метод freeze casting (метод замораживающего литья)	Инженерия тканей спинного мозга	[46]

Заключение

PEDOT:PSS считается наиболее перспективным полимером из-за его низкой стоимости, значительной стабильности, высокой проводимости, биосовместимости и механической прочности. Самое главное, легкая перерабатываемость в водном растворе делает его более привлекательным, чем другие проводящие полимеры, особенно в медицинских целях. В последние годы была проведена обширная работа по изучению PEDOT:PSS для различных применений, и в настоящей статье суммируются последние достижения в области материалов на основе PEDOT:PSS в тканевой инженерии. Методы, используемые для приготовления матриксов на основе PEDOT:PSS, включают в себя электроформование, методы замораживающего литья и прямой адсорбции,

лиофилизацию и 3D печать. Значительные исследования в области тканевой инженерии с использованием PEDOT:PSS находятся в стадии разработки. Такие свойства, как электрохимическая активность, высокая проводимость и механическая стабильность, играют важную роль в демонстрации существенного прогресса композитов PEDOT:PSS в инженерии нервной, сердечной и костной тканей. Распространенные исследования проводились в основном *in vitro*, а в будущих исследованиях следует рассмотреть возможность испытаний существующих материалов *in vivo*.

Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт», в рамках выполнения тематического плана 1.ф.1.2 «Моделирование процессов в нейрональных клетках с целью создания автономных

биоэлектронных систем коррекции патологий и нейроинтерфейсов нового поколения»

Литература

1. *Abedi A., Hasanzadeh M., Tayebi L.* Conductive nanofibrous Chitosan/PEDOT:PSS tissue engineering scaffolds // *Mater. Chem. Phys.* 2019. — Vol. 237. — Art. 121882. doi: 10.1016/j.matchemphys.2019.121882.
2. *Anderson J.C., Eriksson C.* Piezoelectric properties of dry and wet bone // *Nature*. — 1970. — Vol. 227. — No. 5257. — P. 491–492.
3. *Aronin C.E.P. et al.* Comparative effects of scaffold pore size, pore volume, and total void volume on cranial bone healing patterns using microsphere-based scaffolds // *J. Biomed. Mater. Res. A*. — 2009. — Vol. 89. — No. 3. — P. 632–641.
4. *Baker B., Becker R.O., Spadaro J.* A study of electrochemical enhancement of articular cartilage repair // *Clin. Orthop. Relat. Res.* — 1974. — Vol. 102. — P. 251–267.
5. *Baker B. et al.* Electrical stimulation of articular cartilage regeneration // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1974. — Vol. 238. — P. 491–499.
6. *Balint R., Cassidy N.J., Cartmell S.H.* Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering // *Acta Biomaterialia*. — 2014. — Vol. 10. — No. 6. — P. 2341–2353.
7. *Benabid A.L.* Deep brain stimulation for Parkinson's disease // *Curr. Opin. Neurobiol.* — 2003. — Vol. 13. — No. 6. — P. 696–706.
8. *Buck R.P.* Kinetics of bulk and interfacial ionic motion: microscopic bases and limits for the Nernst-Planck equation applied to membrane systems // *Journal of Membrane Science*. — 1984. — Vol. 17. — Issue 1. — P. 1–62.
9. *Collier J.H. et al.* Synthesis and characterization of polypyrrole-hyaluronic acid composite biomaterials for tissue engineering applications // *J. Biomed. Mater. Res.* — 2000. — Vol. 50. — No. 4. — P. 574–584.
10. *Dominguez-Alfaro A. et al.* 3D printable conducting and biocompatible PEDOT-graft-PLA copolymers by direct ink writing // *Macromol. Rapid Commun.* — 2021. — Vol. 42. — No. 12. — e2100100. doi: 10.1002/marc.202100100.
11. *Ferlauto L. et al.* Development and characterization of PEDOT:PSS/alginate soft microelectrodes for application in neuroprosthetics // *Front Neurosci.* — 2018. — Vol. 12. — Art. 648. doi: 10.3389/fnins.2018.00648.
12. *Fukada E., Yasuda I.* On the piezoelectric effect of bone // *J. Phys. Soc. Japan*. — 1957. — Vol. 12. — No. 10. — P. 1158–1162.
13. *Gordon J., Amini S., White M.K.* General overview of neuronal cell culture // *Methods Mol. Biol.* — 2013. — Vol. 1078. — P. 1–8. doi: 10.1007/978-1-62703-640-5_1.
14. *Griffin M. et al.* Enhancement of differentiation and mineralisation of osteoblast-like cells by degenerate electrical waveform in an in vitro electrical stimulation model compared to capacitive coupling // *PLoS One*. — 2013. — Vol. 8. — No. 9. — e72978. doi: 10.1371/journal.pone.0072978.
15. *Guex A.G. et al.* Highly porous scaffolds of PEDOT:PSS for bone tissue engineering // *Acta Biomater.* — 2017. — Vol. 62. — P. 91–101.
16. *Hunter S.R.* Cellular attachment on poly (Lactic acid) for use in tissue engineering. Master's thesis, Western Michigan University, Kalamazoo, MI, USA, 2020. URL: https://scholarworks.wmich.edu/masters_theses/5180.
17. *Hu W.W. et al.* Electrical stimulation to promote osteogenesis using conductive polypyrrole films // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* — 2014. — Vol. 37. — P. 28–36.
18. *Iandolo D. et al.* Biomimetic and electroactive 3D scaffolds for human neural crest-derived stem cell expansion and osteogenic differentiation // *MRS Communications*. — 2020. — Vol. 10. — P. 179–187.
19. *Inal S. et al.* Conducting polymer scaffolds for hosting and monitoring 3D cell culture // *Adv. Biosyst.* — 2017. — Vol. 1. — Issue 6. — Art. 1700052. doi: 10.1002/adbi.201700052.
20. *Jayaram A.K. et al.* 3D hybrid scaffolds based on PEDOT:PSS/MWCNT composites // *Front Chem.* — 2019. — Vol. 7. — Art. 363. doi: 10.3389/fchem.2019.00363.
21. *Kaur G. et al.* Electrically conductive polymers and composites for biomedical applications // *RSC Advances*. — 2015. — Vol. 5. — Issue 47. — P. 37553–37567.
22. *Kim H.S. et al.* Biocompatible composites of polyaniline nanofibers and collagen // *Synth. Met.* — 2009. — Vol. 159. — Issue 13. — P. 1313–1318.
23. *Kühn A.A., Volkmann J.* Innovations in deep brain stimulation methodology // *Mov. Disord.* — 2017. — Vol. 32. — No. 1. — P. 11–19.
24. *Levin M.* Large-scale biophysics: ion flows and regeneration // *Trends Cell Biol.* — 2007. — Vol. 17. — No. 6. — P. 261–270.
25. *Liu Y. et al.* Soft conductive micropillar electrode arrays for biologically relevant electrophysiological recording // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2018. — Vol. 115. — No. 46. — P. 11718–11723.
26. *Loh Q.L., Choong C.* Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size // *Tissue Eng. Part B. Rev.* — 2013. — Vol. 19. — No. 6. — P. 485–502.
27. *Lu B. et al.* Pure PEDOT:PSS hydrogels // *Nat. Commun.* — 2019. — Vol. 10. — No. 1. — Art. 1043. doi: 10.1038/s41467-019-09003-5.
28. *Magaz A. et al.* Modulation of neuronal cell affinity on PEDOT-PSS nonwoven silk scaffolds for neural tissue engineering // *ACS Biomater. Sci. Eng.* — 2020. — Vol. 6. — No. 12. — P. 6906–6916.
29. *Mahmoudinezhad M.H., Karkhaneh A., Jadidi K.* Effect of PEDOT:PSS in tissue engineering composite scaffold on

- improvement and maintenance of endothelial cell function // *J. Biosci.* — 2018. — Vol. 43. — No. 2. — P. 307–319.
30. *McKeon-Fischer K.D. et al.* Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanoparticle and poly(ϵ -caprolactone) electrospun scaffold characterization for skeletal muscle regeneration // *J. Biomed. Mater. Res. A.* — 2015. — Vol. 103. — No. 11. — P. 3633–3641.
 31. *Mellor L.F. et al.* Extracellular calcium modulates chondrogenic and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: A novel approach for osteochondral tissue engineering using a single stem cell source // *Tissue Eng. Part A.* — 2015. — Vol. 21. — No. 17–18. — P. 2323–2333.
 32. *Meng S., Rouabhia M., Zhang Z.* Electrical stimulation modulates osteoblast proliferation and bone protein production through heparin-bioactivated conductive scaffolds // *Bioelectromagnetics.* — 2013. — Vol. 34. — No. 3. — P. 189–199.
 33. *Murphy C.M., Haugh M.G., O'Brien F.J.* The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering // *Biomaterials.* — 2010. — Vol. 31. — No. 3. — P. 461–466.
 34. *Murphy C.M., O'Brien F.J.* Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds // *Cell Adh. Migr.* — 2010. — Vol. 4. — No. 3. — P. 377–381.
 35. *Nikolou M., Malliaras G.G.* Applications of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) doped with poly(styrene sulfonic acid) transistors in chemical and biological sensors // *Chem. Rec.* — 2008. — Vol. 8. — No. 1. — P. 13–22.
 36. *Ohayon D. et al.* Laser Patterning of Self-Assembled Monolayers on PEDOT:PSS Films for Controlled Cell Adhesion // *Adv. Mater. Interfaces.* — 2017. — Vol. 4. — Issue 16. — Art. 1700191. doi: 10.1002/admi.201700191.
 37. *Oliveira K.M.C. et al.* Electrical Stimulation Decreases Dental Pulp Stem Cell Osteo-/Odontogenic Differentiation // *Biores. Open Access.* — 2020. — Vol. 9. — No. 1. — P. 162–173.
 38. *O'Brien F.J.* Biomaterials & scaffolds for tissue engineering // *Materials Today.* — 2011. — Vol. 14. — Issue 3. — P. 88–95.
 39. *Pires F. et al.* Neural stem cell differentiation by electrical stimulation using a cross-linked PEDOT substrate: Expanding the use of biocompatible conjugated conductive polymers for neural tissue engineering // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2015. — Vol. 1850. — No. 6. — P. 1158–1168.
 40. *Pisciotta A. et al.* PEDOT: PSS promotes neurogenic commitment of neural crest-derived stem cells // *Front Physiol.* — 2022. — Vol. 13. — Art. 930804. doi: 10.3389/fphys.2022.930804.
 41. *Pählman S. et al.* Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation // *Cell Differ.* — 1984. — Vol. 14. — No. 2. — P. 135–144.
 42. *Qi G., Huang L., Wang H.* Highly conductive free standing polypyrrole films prepared by freezing interfacial polymerization // *Chem. Commun. (Camb).* — 2012. — Vol. 48. — No. 66. — P. 8246–8248.
 43. *Rad A.T. et al.* Conducting scaffolds for liver tissue engineering // *J. Biomed. Mater. Res. A.* — 2014. — Vol. 102. — No. 11. — P. 4169–4181.
 44. *Rahy A., Yang D.J.* Synthesis of highly conductive polyaniline nanofibers // *Mater. Lett.* — 2008. — Vol. 62. — Issue 28. — P. 4311–4314
 45. *Ramuz M. et al.* Monitoring of cell layer coverage and differentiation with the organic electrochemical transistor // *J. Mater. Chem. B.* — 2015. — Vol. 3. — No. 29. — P. 5971–5977.
 46. *Serafin A. et al.* Electroconductive PEDOT nanoparticle integrated scaffolds for spinal cord tissue repair // *Biomater. Res.* — 2022. — Vol. 26. — No. 1. — Art. 63. doi: 10.1186/s40824-022-00310-5.
 47. *Shahini A. et al.* 3D conductive nanocomposite scaffold for bone tissue engineering // *Int. J. Nanomedicine.* — 2014. — Vol. 9. — P. 167–181.
 48. *Sordini L. et al.* Effect of electrical stimulation conditions on neural stem cells differentiation on cross-linked PEDOT:PSS films // *Front. Bioeng. Biotechnol.* — 2021. — Vol. 9. — Art. 591838. doi: 10.3389/fbioe.2021.591838.
 49. *Sřítěský S. et al.* Printing inks of electroactive polymer PEDOT:PSS: The study of biocompatibility, stability, and electrical properties // *J. Biomed. Mater. Res. A.* — 2018. — Vol. 106. — No. 4. — P. 1121–1128.
 50. *Sun K. et al.* Review on application of PEDOTs and PEDOT:PSS in energy conversion and storage devices // *J. Mater. Sci.: Mater. Electron.* — 2015. — Vol. 26. — P. 4438–4462.
 51. *Tagle J.M., Macchetto P.C., Páramo R.M.D.* Clinical performance of a dermal filler containing natural glycolic acid and a polylactic acid polymer: Results of a clinical trial in human immunodeficiency virus subjects with facial lipoatrophy // *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* — 2010. — Vol. 3. — No. 2. — P. 42–47.
 52. *Thrivikraman G. et al.* Interplay of substrate conductivity, cellular microenvironment, and pulsatile electrical stimulation toward osteogenesis of human mesenchymal stem cells in vitro // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* — 2015. — Vol. 7. — No. 41. — P. 23015–23028.
 53. *Tsai N.C. et al.* Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) polymer composite bioelectrodes with designed chemical and topographical cues to manipulate the behavior of PC12 neuronal cells // *Adv. Mater. Interfaces.* — 2019. — Vol. 6. — No. 5. — Art. 1801576. doi: 10.1002/admi.201801576.
 54. *Wan A.M.D. et al.* 3D conducting polymer platforms for electrical control of protein conformation and cellular functions // *J. Mater. Chem. B.* — 2015. — Vol. 3. — No. 25. — P. 5040–5048.

55. Wang Y. *et al.* 3D bioprinting of conductive hydrogel for enhanced myogenic differentiation // *Regen. Biomater.* – 2021. – Vol. 8. – No. 5. – Art. rbab035. doi: 10.1093/rb/rbab035.
56. *Worfolk B.J. et al.* Ultrahigh electrical conductivity in solution-sheared polymeric transparent films // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2015. – Vol. 112. – No. 46. – P. 14138–14143.
57. Wu Q. *et al.* Flexible 3D printed microwires and 3D microelectrodes for heart-on-a-chip engineering // *Biofabrication.* – 2023. – Vol. 15. – No. 3. – Art. 035023. doi: 10.1088/1758-5090/acd8f4.
58. Xu H. *et al.* Conductive PPY/PDLLA conduit for peripheral nerve regeneration // *Biomaterials.* – 2014. – Vol. 35. – No. 1. – P. 225–235.
59. Yazdimamaghani M. *et al.* Biomineralization and biocompatibility studies of bone conductive scaffolds containing poly(3,4-ethylenedioxythiophene):poly(4-styrene sulfonate) (PEDOT:PSS) // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2015. – Vol. 26. – No. 12. – Art. 274. doi: 10.1007/s10856-015-5599-8.
60. Yuk H. *et al.* 3D printing of conducting polymers // *Nat. Commun.* – 2020. – Vol. 11. – No. 1. – Art. 1604. doi: 10.1038/s41467-020-15316-7.
10. Dominguez-Alfaro A *et al.* 3D printable conducting and biocompatible PEDOT-graft-PLA copolymers by direct ink writing. *Macromol. Rapid Commun* 2021; 42(12):e2100100. doi: 10.1002/marc.202100100.
11. Ferlauto L *et al.* Development and characterization of PEDOT:PSS/alginate soft microelectrodes for application in neuroprosthetics. *Front Neurosci* 2018; 12:648. doi: 10.3389/fnins.2018.00648.
12. Fukada E, Yasuda I. On the piezoelectric effect of bone. *J Phys Soc Japan* 1957; 12(10):1158–1162.
13. Gordon J, Amini S, White MK. General overview of neuronal cell culture. *Methods Mol Biol* 2013; 1078:1–8. doi: 10.1007/978-1-62703-640-5_1.
14. Griffin M *et al.* Enhancement of differentiation and mineralisation of osteoblast-like cells by degenerate electrical waveform in an in vitro electrical stimulation model compared to capacitive coupling. *PLoS One* 2013; 8(9):e72978. doi: 10.1371/journal.pone.0072978.
15. Guex AG *et al.* Highly porous scaffolds of PEDOT:PSS for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 2017; 62:91–101.
16. Hunter SR. Cellular attachment on poly (Lactic acid) for use in tissue engineering. Master's thesis, Western Michigan University, Kalamazoo, MI, USA, 2020. URL: https://scholarworks.wmich.edu/masters_theses/5180.
17. Hu WW *et al.* Electrical stimulation to promote osteogenesis using conductive polypyrrole films. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2014; 37:28–36.
18. Iandolo D *et al.* Biomimetic and electroactive 3D scaffolds for human neural crest-derived stem cell expansion and osteogenic differentiation. *MRS Communications* 2020; 10:179–187.
19. Inal S *et al.* Conducting polymer scaffolds for hosting and monitoring 3D cell culture. *Adv Biosyst* 2017; 1(6):1700052. doi: 10.1002/adbi.201700052.
20. Jayaram AK *et al.* 3D hybrid scaffolds based on PEDOT:PSS/MWCNT composites. *Front Chem* 2019; 7:363. doi: 10.3389/fchem.2019.00363.
21. Kaur G *et al.* Electrically conductive polymers and composites for biomedical applications. *RSC Advances* 2015; 5(47):37553–37567.
22. Kim HS *et al.* Biocompatible composites of polyaniline nanofibers and collagen. *Synth Met* 2009; 159(13):1313–1318.
23. Kühn AA, Volkmann J. Innovations in deep brain stimulation methodology. *Mov Disord* 2017; 32(1):11–19.
24. Levin M. Large-scale biophysics: ion flows and regeneration. *Trends Cell Biol* 2007; 17(6):261–270.
25. Liu Y *et al.* Soft conductive micropillar electrode arrays for biologically relevant electrophysiological recording. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; 115(46):11718–11723.
26. Loh QL, Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size. *Tissue Eng Part B Rev* 2013; 19(6):485–502.
27. Lu B *et al.* Pure PEDOT:PSS hydrogels. *Nat Commun* 2019; 10(1):1043. doi: 10.1038/s41467-019-09003-5.

References

1. Abedi A, Hasanzadeh M, Tayebi L. Conductive nanofibrous Chitosan/PEDOT:PSS tissue engineering scaffolds. *Mater Chem Phys* 2019; 237:121882. doi: 10.1016/j.matchemphys.2019.121882.
2. Anderson JC, Eriksson C. Piezoelectric properties of dry and wet bone. *Nature* 1970; 227(5257):491–492.
3. Aronin CEP *et al.* Comparative effects of scaffold pore size, pore volume, and total void volume on cranial bone healing patterns using microsphere-based scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2009; 89(3):632–641.
4. Baker B, Becker RO, Spadaro J. A study of electrochemical enhancement of articular cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res* 1974; 102:251–267.
5. Baker B *et al.* Electrical stimulation of articular cartilage regeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1974; 238:491–499.
6. Balint R, Cassidy NJ, Cartmell SH. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 2014; 10(6):2341–2353.
7. Benabid AL. Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol* 2003; 13(6):696–706.
8. Buck RP. Kinetics of bulk and interfacial ionic motion: microscopic bases and limits for the Nernst-Planck equation applied to membrane systems. *Journal of Membrane Science* 1984; 17(1):1–62.
9. Collier JH *et al.* Synthesis and characterization of polypyrrole-hyaluronic acid composite biomaterials for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res* 2000; 50(4):574–584.

28. Magaz A et al. Modulation of neuronal cell affinity on PEDOT-PSS nonwoven silk scaffolds for neural tissue engineering. *ACS Biomater Sci Eng* 2020; 6(12):6906–6916.
29. Mahmoudinezhad MH, Karkhaneh A, Jadidi K. Effect of PEDOT:PSS in tissue engineering composite scaffold on improvement and maintenance of endothelial cell function. *J Biosci* 2018; 43(2):307–319.
30. McKeon-Fischer KD et al. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanoparticle and poly(ϵ -caprolactone) electrospun scaffold characterization for skeletal muscle regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2015; 103(11):3633–3641.
31. Mellor LF et al. Extracellular calcium modulates chondrogenic and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: A novel approach for osteochondral tissue engineering using a single stem cell source. *Tissue Eng Part A* 2015; 21(17–18):2323–2333.
32. Meng S, Rouabhia M, Zhang Z. Electrical stimulation modulates osteoblast proliferation and bone protein production through heparin-bioactivated conductive scaffolds. *Bioelectromagnetics* 2013; 34(3):189–199.
33. Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2010; 31(3):461–466.
34. Murphy CM, O'Brien FJ. Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Cell Adh Migr* 2010; 4(3):377–381.
35. Nikolou M, Malliaras GG. Applications of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) doped with poly(styrene sulfonic acid) transistors in chemical and biological sensors. *Chem Rec* 2008; 8(1):13–22.
36. Ohayon D et al. Laser Patterning of Self-Assembled Monolayers on PEDOT:PSS Films for Controlled Cell Adhesion. *Adv Mater Interfaces* 2017; 4(16):1700191. doi: 10.1002/admi.201700191.
37. Oliveira KMC et al. Electrical Stimulation Decreases Dental Pulp Stem Cell Osteo-/Odontogenic Differentiation. *Biores Open Access* 2020; 9(1):162–173.
38. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* 2011; 14(3):88–95.
39. Pires F et al. Neural stem cell differentiation by electrical stimulation using a cross-linked PEDOT substrate: Expanding the use of biocompatible conjugated conductive polymers for neural tissue engineering. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1850(6):1158–1168.
40. Pisciotta A et al. PEDOT: PSS promotes neurogenic commitment of neural crest-derived stem cells. *Front Physiol* 2022; 13:930804. doi: 10.3389/fphys.2022.930804.
41. Pählman S et al. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ* 1984; 14(2):135–144.
42. Qi G, Huang L, Wang H. Highly conductive free standing polypyrrole films prepared by freezing interfacial polymerization. *Chem Commun (Camb)* 2012; 48(66):8246–8248.
43. Rad AT et al. Conducting scaffolds for liver tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2014; 102(11):4169–4181.
44. Rahy A, Yang DJ. Synthesis of highly conductive polyaniline nanofibers. *Mater Lett* 2008; 62(28):4311–4314.
45. Ramuz M et al. Monitoring of cell layer coverage and differentiation with the organic electrochemical transistor. *J Mater Chem B* 2015; 3(29):5971–5977.
46. Serafin A et al. Electroconductive PEDOT nanoparticle integrated scaffolds for spinal cord tissue repair. *Biomater Res* 2022; 26(1):63. doi: 10.1186/s40824-022-00310-5.
47. Shahini A et al. 3D conductive nanocomposite scaffold for bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine* 2014; 9:167–181.
48. Sordini L et al. Effect of electrical stimulation conditions on neural stem cells differentiation on cross-linked PEDOT:PSS films. *Front Bioeng Biotechnol* 2021; 9:591838. doi: 10.3389/fbioe.2021.591838.
49. Stríteský S et al. Printing inks of electroactive polymer PEDOT:PSS: The study of biocompatibility, stability, and electrical properties. *J Biomed Mater Res A* 2018; 106(4):1121–1128.
50. Sun K et al. Review on application of PEDOTs and PEDOT:PSS in energy conversion and storage devices. *J Mater Sci: Mater Electron* 2015; 26:4438–4462.
51. Tagle JM, Macchetto PC, Páramo RMD. Clinical performance of a dermal filler containing natural glycolic acid and a polylactic acid polymer: Results of a clinical trial in human immunodeficiency virus subjects with facial lipoatrophy. *J Clin Aesthet Dermatol* 2010; 3(2):42–47.
52. Thirivikraman G et al. Interplay of substrate conductivity, cellular microenvironment, and pulsatile electrical stimulation toward osteogenesis of human mesenchymal stem cells in vitro. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015; 7(41):23015–23028.
53. Tsai NC et al. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) polymer composite bioelectrodes with designed chemical and topographical cues to manipulate the behavior of PC12 neuronal cells. *Adv Mater Interfaces* 2019; 6(5):1801576. doi: 10.1002/admi.201801576.
54. Wan AMD et al. 3D conducting polymer platforms for electrical control of protein conformation and cellular functions. *J Mater Chem B* 2015; 3(25):5040–5048.
55. Wang Y et al. 3D bioprinting of conductive hydrogel for enhanced myogenic differentiation. *Regen Biomater* 2021; 8(5):rbab035. doi: 10.1093/rb/rbab035.
56. Worfolk BJ et al. Ultrahigh electrical conductivity in solution-sheared polymeric transparent films. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(46):14138–14143.
57. Wu Q et al. Flexible 3D printed microwires and 3D microelectrodes for heart-on-a-chip engineering. *Biofabrication* 2023; 15(3):035023. doi: 10.1088/1758-5090/acd8f4.

58. Xu H et al. Conductive PPy/PDLLA conduit for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 2014; 35(1):225–235.
59. Yazdimamaghani M et al. Biomineralization and biocompatibility studies of bone conductive scaffolds containing poly(3,4-ethylenedioxythiophene):poly(4-styrene sulfonate) (PEDOT:PSS). *J Mater Sci Mater Med* 2015; 26(12):274. doi: 10.1007/s10856-015-5599-8.
60. Yuk H et al. 3D printing of conducting polymers. *Nat Commun* 2020; 11(1):1604. doi: 10.1038/s41467-020-15316-7.

ELECTROCONDUCTIVE POLYMERIC MATERIALS FOR TISSUE ENGINEERING

D.A. KIRILLOVA¹, P.M. GOTOVTSEV^{1,2}, R.G. VASILOV¹

¹ *National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow, Russian Federation;*

² *Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University)*

Electroconductive polymers such as polyaniline, polypyrrole and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) with good biocompatibility have a wide range of biomedical applications including biosensors, neural implants and tissue engineering. This review focuses on conductive polymers for tissue engineering applications. Conductive polymers exhibit excellent electrical conductivity as matrixes for tissue regeneration, and their electrical conductivity allows stimulation of cells cultured on them to be stimulated by electrical signals. However, the mechanical properties of such materials limit their application. Therefore, conductive polymer composites based on conductive polymers have been developed. The main objective of this review is to summarize information about conductive biomaterials, such as conductive hydrogels and conductive composite porous matrixes used in bone tissue engineering, muscle tissue engineering, nerve tissue engineering, and cardiac tissue engineering.

Keywords: tissue engineering; electrically conductive polymers; polymer matrixes; cell cultures; bioengineering.

Address:

Kirillova D.A.

Postgraduate student, National Research Centre

«Kurchatov Institute»

E-mail: d-kirillova@mail.ru

Для цитирования:

Кириллова Д.А., Готовцев П.М., Васильев Р.Г. Электропроводящие полимерные материалы для тканевой инженерии. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2023; 19(4):92–100.

For citation:

Kirillova D.A., Gotovtsev P.M., Vasilov R.G. Electroconductive polymeric materials for tissue engineering. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2023; 19(4):92–100 (in Russian).

К 125-летию со дня рождения З.В. Ермольевой (1898–1974)*



Имя Зинаиды Виссарионовны Ермольевой занимает достойное место в истории отечественной эпидемиологии и микробиологии. В этом году исполняется 125 лет со дня ее рождения. Ее жизнь и деятельность хорошо вписываются в жизнеутверждающую поступь молодого советского государства и общий энтузиазм его населения.

Факты ее жизни и творчества хорошо известны. Поэтому следует остановиться лишь на отдельных моментах. Многие любят говорить сейчас о том или ином деятеле, что он «появился в нужное время и в нужном месте». В случае Ермольевой тоже можно было бы обойтись таким высказыванием. Но этого будет мало. Здесь будет явная недооценка добротной породы и воспитания. В данном случае мы имеем удачный старт, который во многом обеспечил ее будущие успехи.

Она получила прекрасное среднее и высшее образование. Гимназию в Новочеркасске закончила с золотой медалью. Дальше — учеба в авторитетном университете. Известно, что Ростовский университет был создан на базе одного из лучших университетов страны — эвакуированного Варшавского. Среди ее учителей был П.Ф. Здродовский, известный микробиолог. Другой учитель — профессор В.А. Барыкин — привил вкус к изучению холерной инфекции. Он же рекомендовал талантливой девушке перебраться в Москву, где она начала трудиться

с 1920-х годов. Ничего не бывает случайным. Как важно одаренному человеку повстречать на своем пути нужного, благородного и доброжелательного наставника. К тому же опыт работы над проблемой холеры крайне пригодился ей потом во время войны в Сталинграде.

В Москве уже в возрасте 27 лет она возглавила отдел биохимии микробов в Биохимическом институте Наркомздрава РСФСР, который в 1934 году вошел в состав ВИЭМ, одного из лучших медицинских учреждений страны. Это тоже прекрасная школа — быть в такой квалифицированной профессиональной среде. Естественно, занимая столь высокий пост, она привлекалась к решению задач высокого уровня и приобрела необходимый опыт результативного научного руководства.

В 1942 году впервые в СССР З.В. Ермольева получила пенициллин (другое наименование — крустоцин, или пенициллин ВИЭМ) и организовала его производство. Применение пенициллина ВИЭМ для лечения раневых осложнений проводилось в клиниках академиков Н.Н. Бурденко, Н.И. Гращенкова, И.Г. Руфанова и в 14 эвакуогоспиталях. Особенно часто она вспоминала об испытании отечественного пенициллина в конце 1944 года на Прибалтийском фронте, которое проводилось совместно с Н.Н. Бурденко (там был достигнут позитивный эффект — 100%-ное выздоровление раненых).

В 1942 году она была направлена в город Сталинград, где наладила производство холерного бактериофага. Она была удостоена Сталинской премии первой степени (1943) — совместно с Лидией Якобсон (тоже сотрудницей ВИЭМ) «...за участие в организации и проведении большой профилактической работы на фронтах Великой Отечественной войны, за разработку новых методов лабораторной диагностики и фагопрофилактики холеры...». Известно, что в это время у нее были телефонные контакты с Верховным главнокомандующим Сталиным (он даже называл ее шутя «сестрѐнка»: у них были одинаковые отчества).

Кстати, деньги от премии Зинаида Виссарионовна (как и Лидия Якобсон) потратила на постройку истребителя Ла-5, получившего имя «Зинаида Ермольева». Немаловажным событием стал выход в свет ее монографии «Холера» в 1942 году. В ней она обобщила свой собственный опыт борьбы с этой инфекцией. Уже только на основании данного цикла исследований можно заключить, что она была пионером развития реальной биотехнологии в стране.

После Великой Отечественной войны она продолжила цикл своих актуальных, социально востребованных исследований. В 1945–1947 годах Ермольева работала

* Материал подобран В.С. Воробьевым

директором Института биологической профилактики инфекций. Направление изучения антибиотиков тогда набирало силу, и было принято важное государственное решение на базе этого института затем организовать «Всесоюзный научно-исследовательский институт по пенициллину и другим антибиотикам» (позднее он был переименован во Всесоюзный научно-исследовательский институт антибиотиков). Здесь начиная с 1947 года она заведовала отделом экспериментальной терапии. Одновременно с 1952 года и до конца своих дней возглавляла кафедру микробиологии и лабораторию новых антибиотиков Центрального института усовершенствования врачей (ныне: Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования — РМАПО).

Институт, организованный Ермольевой, создавал технологии производства противобактериальных и других препаратов, а также участвовал в разработке методических указаний по применению антибиотиков. Наиболее активный период деятельности института был в 1940—1980-е годы. Его интересы были сосредоточены на производстве природных пенициллинов, стрептомицина, эритромицина, антибиотиков тетрациклиновой группы,

полусинтетических пенициллинов, аминогликозидов, цефалоспоринов, тетрациклинов, иммуносупрессоров и др.

Следует для исторической точности указать на то, что указанный Институт антибиотиков, пройдя сложный путь прогресса и спада, был подвергнут нескольким реорганизациям, особенно в 1990 годы, когда из 800 сотрудников осталось 160 (в цепи: «Государственный научный центр по антибиотикам Министерства промышленности, науки и технологий Российской Федерации», Открытое акционерное общество «Государственный научный центр по антибиотикам» — ОАО ГНЦА), в 2012 году прекратил свое существование. В настоящее время на территории бывшего института планируется реконструкция с целью создания многофункционального комплекса.

В последующие годы после ухода из жизни З.В. Ермольевой государством и обществом было сделано много для увековечения памяти этого замечательного человека. В ее честь были установлены памятники и мемориальные доски, названы учреждения и улицы. В искусстве ее образ привлек писателя Вениамина Каверина и талантливых актрис — Людмилы Чурсиной и Ии Саввиной.

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

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

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



Подписано к печати 15.12.2023
Формат 60/90^{1/8}. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 6,5. Тираж 1000 экз.

ООО «ИЛЬПРЕСС»
105005 Москва, ул. Радио, 23/9, стр. 2