

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

**Научно-практический журнал**

**Основан в 2005 году**

**Главный редактор**

Р.Г. Василов

**Редакционная коллегия**

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

**Редакционный совет**

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

Журнал зарегистрирован в Россохранкультуре  
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

**СОДЕРЖАНИЕ**

**Колонка главного редактора**

К читателям. *Р.Г. Василов* ..... 4

**Оригинальные статьи**

Использование ростостимулирующих добавок в питательных средах для масштабирования производства препарата вакцины чумной живой.

*Н.В. Абзаева, С.Е. Гостищева, Л.С. Катунина, Д.В. Ростовцева, Г.Ф. Иванова, А.В. Костроминов, А.А. Курилова*..... 5

Создание экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов.

*А.О. Аноприенко, А.В. Тюрина, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова*..... 10

Микроклональное размножение ценных сортов картофеля, адаптированных для возделывания в Республике Коми (Европейский Северо-Восток России).

*С.О. Володина, Н.Н. Шергина, В.В. Володин*..... 14

Влияние хронического стресса на биохимические показатели у крыс разного возраста.

*Е.В. Валеева, И.Х. Валеева, И.И. Семина, Д.О. Никитин, А.Г. Мухамеджанова, Р.Д. Мухаметшина, А.Д. Мухаметшина, О.А. Кравцова*..... 18

Оптимизация условий постановки прямого варианта дот-иммуноанализа для детекции холерного токсина.

*О.А. Якушева, Л.П. Алексеев, И.В. Архангельская, В.Д. Кругликов, В.П. Зюзина, М.Э. Яговкин*..... 25

Кинетические характеристики расщепления сахаразы в экстракте биомассы *Trichoderma atroviride* ВКПМ F-1434.

*А.В. Лушников, И.А. Гнеушева, И.Ю. Солохина*..... 31

Аналитические характеристики диагностических препаратов для иммуноанализа особо опасных инфекций.

*И.В. Жарникова, С.А. Курчева, Д.В. Русанова, Т.В. Жарникова* ..... 36

**Обзоры**

Роль административно-правового регулирования в развитии геномных технологий на примере России и зарубежных стран.

*Ю.А. Петушкова, П.А. Каменский*..... 43

Роль экспериментальных биологических моделей в изучении особо опасных инфекций и современные аспекты обеспечения биологической безопасности.

*И.Р. Симонова, Е.А. Березняк, А.В. Тришина*..... 52

**Страницы истории.** Юбилейные и знаменательные даты 2020 года ..... 60

**Правила для авторов** ..... 62

**CONTENTS**

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

To readers. *R.G. Vasilov* ..... 4

**Original articles**

The use of growth-stimulating additives in culture media to scale up the production of a live plague vaccine preparation.

*N.V. Abzaeva, S.E. Gostischeva, L.S. Katunina, D.V. Rostovtseva, G.F. Ivanova, A.V. Kostrominov, A.A. Kurilova* ..... 5

Creation of an experimental preventive preparation based on cholera bacteriophages.

*A.O. Anoprienko, A.V. Tyurina, N.E. Gaevskaya, M.P. Pogozhova* ..... 10

Microclonal propagation of valuable potato varieties adapted for cultivation in the Komi Republic (European North-East of Russia).

*S.O. Volodina, N.N. Shergina, V.V. Volodin* ..... 14

The effect of chronic stress on biochemical parameters in rats of different ages.

*E.V. Valeeva, I.Kh. Valeeva, I.I. Semina, D.O. Nikitin, A.G. Mukhamedzhanova, R.D. Mukhametshina, A.D. Mukhametshina, O.A. Kravtsova* ..... 18

Optimization of the conditions for setting a direct variant of dot-immunoassay for the detection of cholera toxin.

*O.A. Yakusheva, L.P. Alekseev, I.V. Arkhangelskaya, V.D. Kruglikov, V.P. Zyuzina, M.E. Yagovkin* ..... 25

Kinetic characteristics of sucrose cleavage in *Trichoderma atrobrunneum* biomass extract VKPM F-1434.

*A.V. Lushnikov, I.A. Gneusheva, I.Yu. Solohina* ..... 31

Analytical characteristics of diagnostic preparation for immunoassay of particularly dangerous infections.

*I.V. Zharnikova, S.A. Kurcheva, D.V. Rusanova, T.V. Zharnikova* ..... 36

**Reviews**

Role of administrative and legal regulation in the development of genome technologies on the example of Russia and foreign countries.

*Yu.A. Petushkova, P.A. Kamensky* ..... 43

The role of experimental biological models in the study of especially dangerous infections and modern aspects of biological safety.

*I.R. Simonova, E.A. Bereznyak, A.V. Trishina* ..... 52

**Pages of history.** Anniversary and significant dates 2020 ..... 60

**Rules for authors** ..... 62

## К читателям

Третий номер журнала содержит ряд статей на актуальные темы. В статье Абзаевой Н.В. и др. «Исследование ростостимулирующих добавок в питательных средах для масштабирования производства препарата вакцины чумной живой» проведено сравнительное изучение биомасс вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV в зависимости от используемых стимуляторов роста.

Аноприенко А.О. с коллегами (Ростов-на-Дону) на основе исследования биологических и генетических свойств холерных бактериофагов предложили экспериментальный профилактический препарат.

Володина С.О. и др. (Сыктывкар) разработали методы микрклонального размножения двух сортов картофеля «Вычегодский» и «Зырянец», адаптированных к возделыванию в условиях Севера.

Группа авторов из Казани (Валеева Е.В. и др.) провела исследование влияния хронического стресса на биохимические показатели (концентрация глюкозы, активность креатинкиназы и лактатдегидрогеназы) крыс разного возраста.

Якушева О.А. и др. (Ростов-на-Дону) предложили оптимальные варианты и условия постановки прямого варианта дот-иммуноферментного анализа на основе поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов для обнаружения холерного токсина.

Лушников А.В. с соавторами из Орловского государственного аграрного университета им. Н.В. Парахина определили кинетические характеристики расщепления сахаразы в экстракте биомассы *Trichoderma atroviride* ВКПМ F-1434.

Сотрудниками Ставропольского противочумного института (Жарникова И.Р. и др.) выполнена работа с целью определения аналитических характеристик диагностических препаратов для иммуноанализа широкого спектра особо опасных инфекций.

В обзоре Петушковой Ю.А., Каменского П.А. (Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова) проанализирована роль административного права в развитии геномных технологий. Авторами разработана модель административного регулирования для сферы геномных технологий в РФ.

Симонова И.Р. с коллегами из Ростовского-на-Дону противочумного института представили обзор, в котором рассмотрели роль экспериментальных биологических моделей в изучении особо опасных инфекций в контексте биобезопасности.

В заключение приведен материал к 80-летию со дня рождения представителя Казанской биохимической школы профессора В.Г. Винтера (1936—2005).

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

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РОСТОСТИМУЛИРУЮЩИХ ДОБАВОК В ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ ДЛЯ МАСШТАБИРОВАНИЯ ПРОИЗВОДСТВА ПРЕПАРАТА ВАКЦИНЫ ЧУМНОЙ ЖИВОЙ

Н.В. АБЗАЕВА\*, С.Е. ГОСТИЩЕВА, Л.С. КАТУНИНА, Д.В. РОСТОВЦЕВА,  
Г.Ф. ИВАНОВА, А.В. КОСТРОМИНОВ, А.А. КУРИЛОВА

*ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь*

Получены варианты экспериментальных питательных сред на основе ферментативного гидролизата говяжьего мяса с добавлением ростостимулирующих добавок: натрия сернистокислого, аммония молибденовокислого, соли Мора, стимулятора роста гемофильных микроорганизмов. Проведено сравнительное изучение биомасс вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV в зависимости от используемых стимуляторов роста через 24 и 48 ч выращивания. Проведено масштабирование scaling процесса культивирования вакцинного штамма на плотных питательных средах в ферментере. Установлено, что через 48 ч культивирования при 27 °С наибольший объем накопления и лучший показатель жизнеспособности показали варианты сред с использованием молибденовокислого аммония или соли Мора как в эксперименте, так и в условиях производственного цикла.

**Ключевые слова:** ростостимулирующие добавки, питательные среды, биомасса, вакцина чумная живая, жизнеспособность.

### Введение

Лекарственный препарат (ЛП) «Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций», выпускаемый ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, предназначен для иммунопрофилактики чумы. Вакцинацию проводят однократно подкожным, накожным, внутрикожным или ингаляционным способами, ревакцинацию осуществляют накожным способом через 1 год после вакцинации, при неблагоприятной эпидемической обстановке — через 6 месяцев. ЛП производится в России более 70 лет и является референтным иммунобиологическим лекарственным средством.

Действующее вещество препарата — живая культура эталонного вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, относится к III группе патогенности: облигатный паразит, природный ауксотроф, утративший патогенность для человека и животных, но проявляющий остаточную вирулентность для мышей и морских свинок в

больших дозах [11]. Попадая в организм вакцинируемого, производит сочетанный эффект клеточно-гуморальной природы на периферические органы и ткани лимфоидной и ретикуло-эндотелиальной системы, вызывая иммунитет к чуме длительностью до 1 года.

Производственное наращивание биомассы вакцинного штамма чумного микроба непосредственно связано с процессом культивирования, который постоянно совершенствуется в различных направлениях. Сейчас наработка биомассы для получения коммерческого препарата проводится на плотных питательных средах в аппарате для культивирования микроорганизмов Шестеренко (АКМ-Ш).

Главной целью совершенствования процесса культивирования является получение достаточного объема бактериальной массы регламентированных параметров. Одним из важнейших условий на данном этапе служит использование качественных, обеспечивающих рост микроорганизма питательных сред [7, 12, 13].

Внесение питательных добавок и стимуляторов роста позволяет увеличить прирост биомассы микроорганизмов. Стимуляторы вносятся в питательные среды в минимальных дозах, не существенно меняя их состав и обеспечивая увеличение скорости роста и высокое накопление общей бактериальной массы в результате стимулирующего действия. Поэтому, по мнению ряда авторов, использование стимуляторов роста представляет собой актуальное и перспективное решение [1, 2, 5, 6, 14, 21].

© 2020 г. Абзаева Н.В., Гостищева С.Е., Катунина Л.С., Ростовцева Д.В., Иванова Г.Ф., Костроминов А.В., Курилова А.А.

\* **Автор для переписки:**

Абзаева Наталья Вячеславовна

кандидат биологических наук,

заведующий Научно-производственной лабораторией чумных вакцин. Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора

В настоящее время в нормативной документации предусмотрены питательные среды на основе ферментативного гидролизата говяжьего мяса (Хоттингера) и ферментативного гидролизата казеина, имеющих отличные друг от друга ростовые свойства и, соответственно, обеспечивающие различный выход биомассы [3, 4]. Помимо этого, отрабатываются питательные среды на основе кукурузного экстракта сгущенного, сои и другого сырья растительного и животного происхождения [9, 17, 18, 20, 22].

При получении накопительных сред в качестве ростостимулирующих добавок для вакцинного штамма чумного микроба традиционно используется натрий сернистокислый (сульфит натрия) или кровь гемолизованная. Однако поиск и апробация стимуляторов, позволяющих улучшить количественную и качественную составляющую получаемой биомассы, остается актуальным вопросом [8, 10, 15, 19].

Цель работы — изучение возможности применения ростостимулирующих добавок в питательных средах для масштабирования производства препарата вакцины чумной живой.

## Материалы и методы

*Параметры масштабирования.* Для засева экспериментальных бульонных сред использовали посевную культуру, изготовленную путем последовательных пересевов на этапах I, II и III генерации вакцинного штамма. Культивировали  $48 \pm 2$  ч при  $27 \pm 1$  °С.

Для получения биомассы в условиях производственного цикла посевной культурой засеивали АКМ-Ш, культивировали  $48 \pm 2$  ч при  $27 \pm 1$  °С и периодической аэрации через 1,5–2 ч по 10–15 мин. Смыв биомассы проводили сахарозо-желатиновой средой высушивания с тиомочевинной. Все работы осуществляли согласно Промышленному регламенту на производство вакцины чумной живой ПР 01897080-09-16.

*Штаммы.* В работе использовали вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора (депонирован в ГКПМ III–IV групп патогенности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России под № 910301).

*Приготовление экспериментальных питательных сред.* Для накопления бактериальной массы в бульон (агар) на основе ферментативного гидролизата говяжьего мяса (бульон Хоттингера) добавляли ростостимулирующие добавки в следующих вариантах:

- натрий сернистокислый из расчета 350 мг/л;
- аммоний молибденовокислый из расчета 50 мг/л;
- соль Мора из расчета 10 мг/л;
- стимулятор роста гемофильных микроорганизмов из расчета 5 г/л.

*Определение параметров биомассы.* В полученных вариантах бульонных сред определялось количество микробных клеток по ОСО мутности 5 и 10 единиц соответствующего года выпуска через 24 и 48 ч выращивания. В эти же сроки проводился контроль рН. Через 48 ч инкубации определялось количество живых микробных клеток в полученной взвеси.

В биомассе, полученной в АКМ-Ш на плотных питательных средах, определялось общее количество микробных клеток, процент жизнеспособных клеток, выход с 1 мл питательной среды, рН через 48 ч инкубации.

*Определение жизнеспособности вакцинного препарата.* Для определения жизнеспособности использовали агар Хоттингера с натрием сернистокислым 0,25 г/л. Испытания проводили согласно Государственной фармакопее РФ, ФС 3.3.1.0022.15 «Вакцина чумная живая».

Статистический анализ проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для выявления статистической значимости различий результатов использовали t-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Для сравнительного анализа влияния биостимуляторов на накопление биомассы было проведено выращивание вакцинного штамма чумного микроба *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ в жидких питательных средах на основе гидролизата Хоттингера с вариативным добавлением ростостимулирующих добавок.

В качестве основы для приготовления питательных сред использовали гидролизат Хоттингера, в качестве стимуляторов роста применяли натрий сернистокислый, аммоний молибденовокислый, соль Мора и стимулятор роста гемофильных микроорганизмов. Для контроля использовали среду без применения стимуляторов роста.

Аммоний молибденовокислый 4-водный  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  обеспечивает раскрытие пептидных связей белковых молекул, которые становятся более доступными для роста различных микроорганизмов [16]. Соль Мора представляет собой соль закиси железа и аммония двойную серноокислую  $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

В растворах ион  $Fe^{2+}$  даже слабыми окислителями легко окисляется до  $Fe^{3+}$ , что позволяет применять его в научно-исследовательских работах и химических лабораториях как удобную форму препарата железа.

В опыте использовали по 6 образцов каждого варианта бульонной питательной среды со стимулятором роста. Посевную культуру вакцинного штамма вносили

из расчета 20 млн. м.к. на 1 мл питательной среды. Инкубировали 48 ч при  $27 \pm 1$  °С. Всего было исследовано 30 вариантов.

Показано, что наибольший прирост биомассы происходил на средах, в которых в качестве стимуляторов использовался аммоний молибденовокислый и соль Мора (табл. 1).

Таблица 1

**Параметры качества биомасс вакцинного штамма *Y. pestis* EV, выращенных на жидких питательных средах**

Стимулятор роста	Период исследования				
	24 ч		48 ч		
	Количество микробных клеток, млн./мл	pH	Количество микробных клеток, млн./мл	pH	Количество живых микробных клеток, %
Натрий сернистокислый	<500	6,9±0,1	633±5	6,7±0,1	32,1±0,4
Аммоний молибденовокислый	<500	6,7±0,1	750±9	6,6±0,1	39,5±0,9
Соль Мора	500±10	6,7±0,1	833±7	6,5±0,1	35,6±1,7
Стимулятор роста гемофильных микроорганизмов	<500	6,6±0,1	<500	6,3±0,1	19,4±1,1
Без стимулятора (контроль)	<500	6,7±0,1	550±5	6,5±0,1	19,7±2,3

Прирост биомассы в варианте с солью Мора через 24 ч оказался наибольшим и достиг  $500 \pm 10$  млн./мл, а через 48 ч —  $833 \pm 7$  млн./мл. При этом количество жизнеспособных клеток составило  $35,6 \pm 1,7\%$ . Для варианта с использованием молибденовокислого аммония значительный прирост биомассы наблюдался через 48 ч и составил  $750 \pm 9$  млн./мл при количестве жизнеспособных клеток  $39,5 \pm 0,9\%$ .

Среда с сернистокислым натрием показала более низкую результативность — общий прирост через 48 ч составил  $750 \pm 9$  млн./мл, жизнеспособность —  $32,1 \pm 0,4\%$ . Контрольная среда без использования ростостимулирующих добавок обеспечила прирост  $550 \pm 5$  млн./мл на 2-е сутки и  $19,7 \pm 2,3\%$  живых микробов.

При этом стоит отметить наиболее низкие показатели при использовании стимулятора роста гемофильных микроорганизмов — менее 500 млн./мл и  $19,4 \pm 1,1\%$  жизнеспособности через 48 ч культивирования. К тому же данный стимулятор способствует опалесценции бульона, что затрудняет определение общего количества микробных клеток.

При использовании жидких питательных сред в качестве накопительных важное значение имеет изме-

нение кислотно-щелочной реакции бульона в процессе культивирования. Для растущей культуры изменение pH среды закономерно происходит в сторону закисления — изначальный показатель 7,2 во всех вариантах среды снижается до 6,3–6,7.

Для следующего этапа работы, а именно: изучения влияния ростостимулирующих добавок на накопление биомассы в производственных масштабах, было проведено выращивание вакцинного штамма на плотной питательной среде в АКМ-Ш в условиях производственного цикла. Основой для получения экспериментальных и контрольной сред служил агар Хоттингера. Всего было проведено четыре выращивания с использованием для каждого отдельного опыта одного из ранее опробованных в жидких питательных средах стимулятора роста: натрия сернистокислого, аммония молибденовокислого, соли Мора и стимулятора роста гемофильных микроорганизмов. Для контроля использовали среду без применения стимуляторов роста.

После смыва бакмассы с плотной питательной среды в АКМ-Ш определяли количество микробных клеток, процент жизнеспособности, pH и рассчитывали выход биомассы с 1 мл питательной среды. Полученные результаты представлены в таблице 2.

**Параметры качества биомассы вакцинного штамма *Y. pestis* EV,  
выращенных на плотных питательных средах в АКМ-Ш**

Стимулятор роста	Параметры биомассы			
	Количество микробных клеток, млрд./мл	pH	Количество живых микробных клеток, %	Выход с 1 мл питательной среды, млрд.
Натрий сернистокислый	70	7,2±0,1	77,4±2,7	2,9
Аммоний молибденовокислый	100	7,4±0,1	82,5±3,7	4,2
Соль Мора	110	7,3±0,1	79,9±6,3	4,6
Стимулятор роста гемофильных микроорганизмов	75	7,5±0,1	52,4±0,7	3,1
Без стимулятора (контроль)	55	7,2±0,1	60,3±1,4	2,3

Показано, что соль Мора, как и аммоний молибденовокислый, обеспечивают наивысший прирост биомассы — выход с 1 мл питательной среды составляет более 4 млрд. микробных клеток. При этом процент живых микробов при использовании этих ростостимулирующих добавок, а также в опыте с сернистокислым натрием максимальный — 77,4±2,7 — 82,5±3,7%. pH смывой микробной взвеси меняется в сторону защелачивания.

### Заключение

Из проведенного эксперимента следует, что с целью создания новой накопительной среды, в частности, для выращивания бактериальной массы чумного микроба, целесообразно дальнейшее изучение опробованных стимуляторов роста — соли Мора и молибденовокислого аммония.

Анализируя результаты эксперимента, необходимо учитывать, что промышленное выращивание бакмассы в ферментере проводится с аэрированием и в гораздо больших масштабах, обеспечиваемых объемом ферментера. В данном случае важен вопрос масштабирования, ведь при увеличении объемов загрузки и изменении параметров процесса зачастую изменяется воспроизводимость результатов, полученных опытным путем. В данном случае как опытный, так и масштабированный процесс показал сопоставимые результаты для таких добавок, как соль Мора и аммоний молибденовокислый.

Таким образом, применение ростостимулирующих добавок в питательных средах для накопления биомассы вакцинного штамма чумного микроба не ограничивается используемым на сегодняшний день сернистокислым натрием. Применение для этой цели молибденовокислого аммония или соли Мора позволяет получить лучший результат. Дальнейшее изучение эффективности питательных сред с различными стимуляторами роста в сочетании

с нетрадиционными основами даст возможность получить новые среды накопления, в том числе и для глубинного культивирования вакцинного штамма чумного микроба.

### Литература

1. Адамович С.Н., Федосеев А.П., Киборт Р.В. Перспективные стимуляторы повышения выхода бактериальной массы *Staphylococcus aureus* (для получения протеина А) // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. — 2012. — № 5-1(87). — С. 173–176.
2. Анганова Е.В., Мирскова А.Н., Савченков М.Ф. и др. Использование биологически активных соединений в качестве стимуляторов роста стафилококков // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). — 2014. — Т. 125(2). — С. 75–79.
3. Ахапкина И.Г. Блинкова Л.П. Питательные среды как искусственная среда роста и развития микроорганизмов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии (ЖМЭИ). — 2001. — № 6. — С. 99–104.
4. Василенко Е.И. К вопросу о питательных средах для непрерывного культивирования микроорганизмов. Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями: матер. Всероссийской науч.-практ. конф. — Нижний Новгород, 2016. — С. 140–144.
5. Вережкина М.Н. Применение стимуляторов роста микроорганизмов в биологической промышленности: сборник / Перспективы развития современного научного знания — сборник научных трудов. Чувашский государственный педагогический университет им. И.Я. Яковлева. — 2011. — С. 70–74.
6. Городницкая Н.И., Мартынов А.В., Осолодченко Т.П. Результаты исследования действия энхансеров на наращивание биомассы микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa*, перспективных для биотехнологии // Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина. Серия Медицина. — 2008. — № 15(797). — С. 9–12.



7. Дзержинская И.С. Питательные среды для выделения и культивирования микроорганизмов: учебное пособие. – Астраханский гос. техн. университет, Астрахань, 2008. – 236 с.
8. Лукьянова С.В., Гефан Н.Г., Адамович С.Н., Оборина Е.Н и др. Изучение действия биологически активного соединения трис(2-гидроксиэтил)аммоний 4-хлорфенилсульфанилацетата на рост бактерий *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus* // Acta Biomedica Scientifica. – 2020. – № 5(1). – Р. 47–53.
9. Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Ломов Ю.М и др. Сравнительная оценка белковых гидролизатов при создании на их основе универсальной питательной среды для диагностики чумы и холеры // Клиническая лабораторная диагностика. – 2011. – № 6. – С. 46–48.
10. Мирскова А.Н., Адамович С.Н., Виноградов Е.Я., Мирсков Р.Г. Стимуляторы роста менингококка для диагностики менингита на основе солей 2-гидроксиалкиламинов // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2012. – № 5-1 (87). – С. 276–280.
11. Основные требования к вакцинным штаммам чумного микроба. Методические указания. МУ 3.3.1.1113–02.
12. Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии. – СПб.: ЭЛБИ-СПб., 2008. – С. 37–38.
13. Попова П.Ю., Микшис Н.И., Тучков И.В. и др. Базовые методы и универсальные конструкции в создании и усовершенствовании чумных вакцин: практические решения / В кн.: Современные проблемы эпидемиологии и гигиены: Материалы VII Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. – Санкт-Петербург, Россия: ЭЛБИ-СПб., 2015. – 350 с. – С. 173–174.
14. Сизоненко М.Н., Тимченко Л.Д., Ржепаковский И.В. Влияние нового стимулятора роста микроорганизмов «СРМП» на биологические свойства *Listeria monocytogenes* вакцинный штамм «АУФ» // Аллергология и иммунология. – 2013. – Т. 14(3). – С. 198.
15. Телишевская Л.Я., Ночевный В.Т. Минеральные элементы в жизнедеятельности и метаболизме патогенных бактерий // Ветеринарная патология. – 2015. – № 4(54). – С. 19–28.
16. Терентьева, Л.И., Антасарова Р.А., Орел Л.Л. Молибденово-кислый аммоний как фактор повышения чувствительности жидких питательных сред для диагностики чумного микроба / Современные аспекты эпиднадзора за особо опасными инфекциями: Тезисы. XIII конф. противочумных учреждений Средней Азии и Казахстана. – Алма-Ата, 1990. – С. 91–93.
17. Трошкова Г.П., Мазуркова Н.А., Сумкина Т.П и др. Технология получения гидролизата сои с использованием протеолитического фермента бромелайна и оценка ростовых свойств питательной среды на его основе для перевиваемых культур клеток // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – № 1. – С. 45–47.
18. Федотова Н.В., Бирюков В.В., Герман Л.С., Поляков А.Н. Ферментализат глютена как ростовой фактор процесса ферментации // Биотехнология. – 2009. – № 4. – С. 64–68.
19. Чичерина В.Р., Сапрыкина Е.Ю. Влияние тяжелых металлов на рост бактерий рода *Bacillus* // Шаг в науку. – 2016. – № 1. – С. 119–125.
20. Lomova N.N., Snezhko O.O., Narizhnyy S.A. The biomass of *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium longum* in dairy medium with bee pollen // Biotechnologia Acta. – 2015. – Vol. 8(1). – Р. 71–75.
21. Pallah O.V., Meleshko T.V., Bati V.V., Boyko N.V. Extracts of edible plants stimulators for beneficial microorganisms // Biotechnologia Acta. – 2019. – Vol. 12 (3). – Р. 67–74.
22. Van Eys J.E. Manual of quality analyses for soybean products in the feed industry. 2<sup>nd</sup> edition. – 2012, U.S.

## THE USE OF GROWTH-STIMULATING ADDITIVES IN CULTURE MEDIA TO SCALE UP THE PRODUCTION OF A LIVE PLAGUE VACCINE PREPARATION

N.V. ABZAEVA, S.E. GOSTISCHEVA, L.S. KATUNINA, D.V. ROSTOVTSSEVA,  
G.F. IVANOVA, A.V. KOSTROMINOV, A.A. KURILOVA

*Stavropol Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Stavropol*

The variants of experimental nutrient media based on beef meat enzymatic hydrolyzate were obtained. Such stimulators of growth as ammonium molybdenum acid, Mohr salt, and a growth stimulator of hemophilic microorganisms were added to the composition of the media. We carried out a comparative study of the biomass of the vaccine strain *Yersinia pestis* EV using different growth stimulants after 24 and 48 hours of cultivation. We conducted scaling of cultivation process of the vaccine strain on solid media in a fermenter. We found out that the greatest accumulation volume and the best viability indicator were shown by media options using ammonium molybdenum acid or Mohr salt both in the experiment and in the production cycle after 48 hours of cultivation at 27 °C.

**Keywords:** growth-promoting additives, growth media, biomass, attenuated plague vaccine, viability.

## СОЗДАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

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

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

Целью нашего исследования стало изучение биологических и генетических свойств холерных бактериофагов и разработка экспериментального профилактического препарата на их основе. В работу были отобраны четыре холерных фага, перспективных для создания экспериментального профилактического препарата из коллекции лаборатории бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. В работе использовались общепринятые методы. Исследования показали высокую эффективность применения данной фаговой смеси для ее профилактического использования. Разработанный экспериментальный фаговый препарат функционировал в организме животного до 8 суток и обеспечивал его защиту от развития инфекционного процесса у большинства животных (>70%), что свидетельствует о перспективности применения его в профилактических целях.

*Ключевые слова:* холерные бактериофаги, фаговый препарат, антибиотикорезистентность, профилактика холеры.

### Введение

Холера как острая, особо опасная инфекционная болезнь, вызываемая бактериями *Vibrio cholerae*, продолжает оставаться глобальной проблемой. Угроза возникновения масштабных эпидемий и вспышек холеры определяет необходимость постоянного мониторинга этой инфекции, предотвращения ее распространения [11, 14]. Всемирная организация здравоохранения рекомендует профилактические меры, включающие в себя массовые вакцинации против холеры [4, 22]. Но, к сожалению, у вакцины есть ограничения и противопоказания (аллергия, возраст, беременность и грудное вскармливание) [23]. В связи с развитием антибиотикорезистентности крупномасштабная вакцинация нецелесообразна и просто невозможна в результате нехватки холерной вакцины, что определяет необходимость оптимизации современной профилактики. В сложившейся ситуации альтернативу antimicrobial препаратам в профилактике бактериальных инфекций могут составить бактериофаги [19].

Несмотря на то, что химиопрофилактика антибиотиками эффективно снижает заболеваемость холерой

[10, 15], побочные реакции на антибиотики хорошо известны и включают в себя случаи анафилаксии, нефротоксичности, кардиотоксичности, гепатотоксичности и нейротоксичности, а также ряда желудочно-кишечных и гематологических осложнений [20]. Типичные ошибки при проведении антибактериальной терапии состоят в неправильном выборе препарата, неверном пути введения и выборе дозы, преждевременном прекращении или нарушении схемы приема антибиотика. Эти обстоятельства вызвали неуклонно растущую устойчивость бактерий к антибактериальным препаратам [2].

В связи с этим актуальными становятся исследования, направленные на изучение бактериофагов. Фаготерапия способна усиливать действие антибиотиков, а в некоторых случаях даже может быть эффективнее. Кроме того, установлен тот факт, что при этиотропной терапии фагами бактерии становятся менее вирулентными. В результате препараты на основе бактериофагов могут быть хорошим дополнением к проводимой антибактериальной терапии [3].

Однако, если технология производства профилактических и лечебных фагов для многих видов микроорганизмов достаточно известна, то в отношении холерных бактериофагов сведений мало, так как исследования по этой проблеме были прекращены в 1970-х годах [7].

В настоящее время в арсенале коммерческих профилактических препаратов отсутствуют холерные бактериофаги. Анализ состояния проблемы на современном этапе течения 7-й пандемии свидетельствует в пользу необходимости испытания новых подходов

© 2020 г. Аноприенко А.О., Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Погожова М.П.

\* Автор для переписки:

Аноприенко Анна Олеговна  
младший научный сотрудник лаборатории бактериофагов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора,  
E-mail: nyra.anoprienko.1985@gmail.com

в вопросе о возможности фагопрофилактики холеры [8, 16, 21].

Целью настоящего исследования стало изучение биологических и генетических свойств холерных бактериофагов и разработка экспериментального профилактического препарата на их основе.

### Материалы и методы

Для разработки экспериментального профилактического препарата в работу были отобраны четыре перспективных холерных фага из коллекции бактериофагов лаборатории ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Размножение фагов осуществляли на индикаторных культурах *V. cholerae* El Tor 75 М, КМ 199 (Р-3169). Штаммы и фаги холерных вибрионов бактерий выращивали на бульоне и 0,7%, 1,5% агаре Мартена (рН 7,6–7,8).

Для изучения морфологии негативных колоний фагов проводили высевы фага методом агаровых слоев. Изучение колоний осуществляли после выращивания при 37 °С в течение суток. Отмечали форму и величину негативных колоний, характер краев, степень прозрачности, наличие вторичного роста и величину зоны неполного лизиса по периферии.

Специфичность бактериофагов испытывали на 130 штаммах бактерий близкородственных родов и семейств (*Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*).

В исследовании использовали специфические сыворотки, полученные нами путем внутривенной иммунизации кроликов возрастающими дозами холерных бактериофагов [13]. Серологическую идентификацию осуществляли двумя методами: качественной реакцией нейтрализации и количественной [1].

Выделение ДНК фагов проводили в соответствии с методиками [6, 12, 24].

Для оценки эффективности профилактического применения фага *in vivo* на модели генерализованной формы инфекции беспородных белых мышей заражали внутрибрюшинно взвесью 18-часовой агаровой культуры (37 °С) холерного вибриона в 0,3% агаризованном 0,9% растворе хлорида натрия в дозе 108 м. кл. в объеме 0,2 мл. Фаговую смесь вводили перорально в концентрациях  $n \times 10^9$  —  $n \times 10^{10}$  БОЕ/мл один раз в сутки в течение 3 суток перед заражением (профилактика), а также по три дня до и после заражения (профилактика с лечением). Работа с экспериментальными животными выполнялась в соответствии с законодательством Российской Федерации и Директивой Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [9].

### Результаты и обсуждение

При отборе холерных бактериофагов учитывались следующие показатели: специфичность литического действия в отношении вибрионов, максимально высокая репродуктивная активность, степень лизиса гомологичных бактерий, продолжительность культивирования, скорость размножения, посевные дозы бактерий и фагов.

Перспективными для проведения исследования оказались холерные фаги, обладающие высокой литической активностью. Спектр литической активности одного из фагов имеет широкий диапазон, включающий в себя холерные вибрионы биоваров Classical (64,6%) и El Tor (56%). Диапазон литической активности второго (70%) и третьего (57,5%) фагов распространяется только на холерные вибрионы биовара El Tor. Четвертый бактериофаг обладает высокой литической активностью в отношении *V. cholerae* O139 серогруппы (50%).

Специфичность фагов в отношении хозяина подтверждена на большом наборе представителей близкородственных микроорганизмов семейств *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, которые не лизировались испытываемыми фагами.

По данным электронно-микроскопического исследования, № 1, № 3 и № 6 холерные бактериофаги относились к III морфогруппе, холерный фаг № 9 к V морфогруппе [17]. Типы № 1, № 3 и № 6 фагов относятся к семейству *Podoviridae*, № 9 — к семейству *Myoviridae* [18].

При изучении геномов экспериментальных диагностических холерных бактериофагов анализ нуклеотидных последовательностей показал, что геном фага Rostov-6 состоит из 39934 т.п.н., в нем идентифицировано 15 открытых рамок считывания. Было обнаружено при сравнении с имеющимися в базе генами 13 последовательностей, гомологичных бактериальным геномам, — это 86,67% от общего их числа и всего 2 похожи на фаговые — 13,33 %, причем не из группы *Vibrio* (*Bordetellaphage* и *Salmonellaphage*).

Судя по наличию бактериальных генов и интегразы, бактериофаг Rostov-6 является умеренным. В результате этого в дальнейших исследованиях он был заменен на фаг № 3.

Далее проводили изучение геномов бактериофагов № 1 и № 3. Анализ нуклеотидных последовательностей бактериофага № 1 показал, что размер генома составляет 37247 т.п.н., а № 3 состоит из 31129 т.п.н.

В ходе эксперимента выявлено, что бактериофаги не содержат генетических детерминант токсинов, антибиотикорезистентности и интеграз. Данные фаги явля-

ются литическими и перспективными компонентами для создания профилактического препарата против холеры.

Генетические свойства бактериофага № 9 в настоящее время изучаются.

Следующим этапом работы было исследование экспериментальной модели профилактики в отношении генерализованной инфекции у белых мышей.

В результате нашей работы на данном этапе *in vitro* были отобраны холерные бактериофаги № 1 и № 3 с широким спектром литического действия, из которых была приготовлена смесь 1:1.

В опытах *in vivo* использовали штамм *V. cholerae* El Tor 19243, устойчивый к стрептомицину, фуразолидону, триметоприму, сульфаметоксазолу, налидиксовой кислоте.

Сравнительное изучение эффективности фагов осуществляли в одном опыте, количество опытов не менее двух при числе животных (беспородные белые мыши) в группе не менее 10. Наблюдение за животными осуществляли в течение 10 дней. Проводили бактериологический контроль заражения и эффективности профилактики. Опыт учитывали при 100% гибели контрольных (нелеченных) животных. Статистическую обработку данных проводили по таблице А.Я. Боярского [5].

Профилактическое применение бактериофагов перед заражением защищало от развития инфекционного процесса 70% животных. Применение фагов самостоятельно, а также фагопрофилактика не уступали действию эффективных антибактериальных препаратов (90% выживших животных). По окончании эксперимента животных усыпляли хлороформом.

Далее проводили изучение фармакодинамики экспериментального профилактического фагового препарата *in vivo*. Для работы было отобрано 8 кроликов (2,5 кг), которые были разделены на 4 группы. Фаговую композицию вводили *per os* в объеме 1 мл один раз в сутки по схеме (табл. 1).

Таблица 1

Схема введения фагового препарата

Группы кроликов	Фаговая композиция в объеме 1 мл/1 раз сут.			
	однократно	3 дня	5 дней	7 дней
1	+	-	-	-
2	-	+	-	-
3	-	-	+	-
4	-	-	-	+

В исследованиях установлено, что экспериментальный фаговый препарат функционирует в организме до 3

суток и выделяется из крови и испражнений кролика при однократном введении (1-я группа).

У второй группы фаговый препарат выделялся из крови и испражнений кролика до 6 суток, у 3- и 4-й групп — до 8 суток.

На основании результатов этих исследований могут быть выбраны релевантные виды животных, которые будут использованы в дальнейших фармакологических и токсикологических исследованиях *in vivo*. Объединенные результаты исследований *in vitro* и *in vivo* позволяют провести экстраполяцию полученных экспериментальных данных на человека.

### Заключение

Разработанный экспериментальный фаговый препарат функционировал в организме животного до 8 суток и обеспечивал его защиту от развития инфекционного процесса у большинства животных (>70%), что свидетельствует о перспективности применения его в профилактических целях.

### Литература

1. Адамс М. Бактериофаги. — М., 1961. — 527 с.
2. Асланов Б.И. Бактериофаги — эффективные антибактериальные средства в условиях глобальной устойчивости к антибиотикам // Медицинский совет. — 2015. — № 13. — С. 106–109.
3. Бактериофаги: биология и практическое применение / Под ред. Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. Пер. с англ.: коллектив пер.; науч. ред. рус. изд. А.В. Летаров. — М: Науч. мир, 2012. — 640 с.
4. Беспалова И.А., Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Филиппенко А.В., Труфанова А.А. Современное состояние специфической профилактики холеры // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2018. — Т. 17. — № 1. — С. 55–61.
5. Боярский А.Я. Статистические методы в экспериментальных медицинских исследованиях. — М., 1955. — 263 с.
6. Габрилович И.М. Практическое пособие по бактериофагии. — Минск, 1968. — 10 с.
7. Гаевская Н.Е., Кудрякова Т.А., Качкина Г.В., Алиева А.А., Саямов С.Р. Отбор бактериофагов для лечения экспериментальной холеры, вызванной классическими холерными вибрионами // Современные наукоемкие технологии. — 2004. — № 3. — С. 11–15.
8. Гаевская Н.Е., Македонова Л.Д., Овсова Л.М., Лупилина С.Ю. Перспективы применения холерных бактериофагов в арсенале средств борьбы с холерой / Актуал. вопр. инфекционной патологии юга России: Матер. межрегион.

- форума специалистов с заседанием профильной комиссии по специальности «Инфекционные болезни» Министерства здравоохранения РФ. — Краснодар, 2016. — С. 49–51.
9. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. — СПб.: 48.
  10. Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н. Оценка антибактериального действия на холерный вибрион (на примере вещества ацетил - N - цистеина - L) // Здоровье населения и среда обитания. — 2019. — № 3(312).— С. 55–57.
  11. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Ренгач М.В., Ежова М.И. О результатах мониторинговых исследований на холеру на территории Российской Федерации в 2018 году / Холера и патогенные для человека вибрионы: матер. пробл. комиссии. — Ростов-на-Дону, 2019. — Вып. 32. — С. 65–69.
  12. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии: Молекулярное клонирование. — М., 1984. — 458 с.
  13. Марьина Ю.Н. Получение антифаговой сыворотки и изучение антигенной структуры фага / Тр. Ростовского противочум. ин-та. — 1941. — № 2. — С. 3–7.
  14. Меньшикова Е.А., Титова С.В, Курбатова Е.М., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Москвитина Э.А. Экологические факторы, влияющие на распространение холеры // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. — 2018. — Т. 7. — № 3. — С. 88–94.
  15. Селянская Н.А., Егиазарян Л.А., Тришина А.В., Березняк Е.А., Веркина Л.М., Симонова И.Р. Чувствительность к антибактериальным препаратам холерных вибрионов Эль-Тор, выделенных из объектов окружающей среды на территории Ростова-на-Дону // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. — 2018. — Т. 7. — № 3. — С. 20–25.
  16. Старкова О.М., Одегова Т.Ф., Главатских И.А. Определение емкости рынка бактериофагов на региональном уровне // Фармация на современном этапе — проблемы и достижения. — М., 2000. — № 1. — С. 133–135.
  17. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. — М., 1968. — 89 с.
  18. Ackerman H.B. Bacteriophage taxonomy in 1987 // Microbiol. Sci. — 1987. — Vol. 4. — No. 7. — P. 214–218.
  19. Bourdin G., Navarro A., Sarker S.A., Pittet A.C., Qadri F., Sultana S., Cravioto A., Talukder K.A., Reuteler G., Brüßow H. Coverage of diarrhea-associated *Escherichia coli* isolates from different origins with two types of phage cocktails // Microb. Biotechnol. — 2014. — Vol. 7(2). — P. 165–176.
  20. Granowitz E.V., Brown R.B. Antibiotic adverse reactions and drug interactions // Crit. Care Clin. — 2008. — Vol. 24(2). — P. 421–422.
  21. Leberberg J. Smaller fleas... ad infinitum: Therapeutic bacteriophage // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1996. — Vol. 93(8). — P. 3167–3168.
  22. Qadri F., Wierzba T.F., Ali M., Ph. D., Chowdhury F., Khan A.I., Saha A. et al. Efficacy of a single-dose, inactivated oral cholera vaccine in Bangladesh // N. Engl. J. Med. — 2016. — Vol. 374(18). — P. 1723–1732.
  23. Wong K.K., Burdette E., Mahon B.E., Mintz E.D., Ryan E.T., Reingold A.L. Recommendations of the advisory committee on immunization practices for use of cholera vaccine // MMWR Morb. Mortal Wkly Rep. — 2017. — Vol. 66(18). — P. 482–485.
  24. Yamamoto K.R., Alberts B.M., Berzinger R., Lawhorne L., Treiber G. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification // Virology. — 1970. — Vol. 40(3). — P. 734–744.

## CREATION OF AN EXPERIMENTAL PREVENTIVE PREPARATION BASED ON CHOLERA BACTERIOPHAGES

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

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

The purpose of our research was to study the biological and genetic properties of cholera bacteriophages and to develop an experimental prophylactic drug based on phages. We selected 4 cholera phages that are promising for creating an experimental prophylactic drug from the collection of the bacteriophage laboratory of the Rostov-on-Don Antiplague Institute of Rospotrebnadzor. Generally accepted methods were used in the work. Studies have shown a high efficiency of using this phage mixture for its preventive use. The developed experimental phage drug functioned in the animal's body for up to 8 days and provided its protection from the development of the infectious process in most animals (>70%), which indicates the prospects of its use for preventive purposes.

*Keywords:* cholera bacteriophages, phage preparation, antibiotic resistance, cholera prevention.

# МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ЦЕННЫХ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ, АДАПТИРОВАННЫХ ДЛЯ ВОЗДЕЛЫВАНИЯ В РЕСПУБЛИКЕ КОМИ (ЕВРОПЕЙСКИЙ СЕВЕРО-ВОСТОК РОССИИ)

С.О. ВОЛОДИНА<sup>1,2\*</sup>, Н.Н. ШЕРГИНА<sup>1</sup>, В.В. ВОЛОДИН<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт агробиотехнологий им. А.В. Журавского ФИЦ «Коми НЦ УрО РАН»,

<sup>2</sup>Институт биологии ФИЦ «Коми НЦ УрО РАН», Сыктывкар

Получены микроклоны и разработаны методы микроклонального размножения двух сортов картофеля «Вычегодский» и «Зырянец» селекции Института агробиотехнологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, адаптированные к возделыванию в условиях Севера. Оптимальной для получения микроклонов из этиолированных проростков картофеля оказалась среда Мурасиге — Скуга (II) с добавлением фитогормонов БАП (1 мг/л) и НУК (0,5 мг/л). Для микроклонального размножения картофеля использовалась безгормональная среда (V). Установлено, что растения-регенеранты, полученные от разных сортов картофеля, отличались по скорости роста, начиная с первого пассажа. Скорость роста побегов растений-регенерантов сорта «Вычегодский» была выше, чем сорта «Зырянец». Период роста побегов растений сорта «Вычегодский» до высоты пробирок (12 см) и готовность к следующему пассажиру занимал не более 20–25 дней.

**Ключевые слова:** картофель, микроклональное размножение, северные сорта, «Вычегодский», «Зырянец», Северные территории России, питательные среды.

## Введение

Из-за универсальности потребительских свойств картофеля этой сельскохозяйственной культуре пока нет другой альтернативы, как по вкусовым качествам, так и по пищевой ценности. Будучи нетребовательным к условиям выращивания, картофель имеет громадное экономическое значение в России и за рубежом. Большие возможности для получения высоких урожаев картофеля имеются в Северо-Западном федеральном округе, в который входит Республика Коми.

Республика Коми относится к зоне рискованного земледелия. Крайний северо-восток Республики Коми занимает тундра, южнее расположена узкая полоса лесотундры, сменяющаяся к югу обширными лесными пространствами. На зону тундровой растительности приходится около 2% площади республики, лесотундровой — около 8,1%, таёжной — около 89%, луговой — менее 1%. Погодно-климатические особенности, характерные для этой территории, такие как короткий безморозный период, возврат холодов в начале вегетационного периода, длинный световой день в

июне — августе (16–18 часов), большое количество осадков в сентябре, определяют особые требования к подбору сортов картофеля для выращивания, которые должны обладать высокой пластичностью и устойчивостью к стрессовым факторам абиотического и биотического характера. Сорта картофеля, рекомендуемые для выращивания на Севере, должны быть раннеспелыми, устойчивыми к грибным патогенам, которые активизируются в условиях повышенной влажности и умеренных температур и вызывают фитофтороз, альтернариоз и рак картофеля. Такие сорта должны быть также устойчивыми к поражению распространившейся на территории Республики Коми золотистой картофельной цистообразующей нематоды.

Ранее было показано, что новые сорта картофеля «Зырянец» и «Вычегодский», оригинаторами которых являются ФГБНУ ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха и Институт агробиотехнологии им. А.В. Журавского ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, сочетают в себе необходимые для выращивания на Севере характеристики: высокую урожайность (до 30 т/га), питательную ценность, устойчивость к фитофторозу и альтернариозу по ботве и клубням, раку картофеля; устойчивы к поражению золотистой цистообразующей нематоды [4–6]. Оба сорта рекомендуются к возделыванию в Республике Коми и в других областях Северного и Уральского регионов.

Для ускоренного размножения перспективных сортов картофеля и производства оздоровленного посадочного

© 2020 г.

\* Автор для переписки:

Володина Светлана Олеговна

ст.н.с. отдела сельскохозяйственной геномики ФГБУН «Институт агробиотехнологий им. А.В. Журавского Федерального исследовательского центра Коми научного центра УрО РАН»

E-mail: svetlana20664@yandex.ru

материала в настоящее время широко используются методы микрклонального размножения картофеля в культуре *in vitro* и получения микро- и мини-клубней в условиях *in vivo* [1–3].

Настоящая работа посвящена подбору оптимальных питательных сред для получения микрклонов и дальнейшего микрклонального размножения растений-регенерантов, а также сравнительному изучению роста и мультипликации побегов сортов картофеля «Вычегодский» и «Зырянец» в условиях *in vitro*.

### Материалы и методы

Экспериментальную работу по микрклональному размножению картофеля проводили в отделе сельскохозяйственной геномики Института агробиотехнологии и в лаборатории биохимии и биотехнологии Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН в течение 2019–2020 гг. В лабораторном эксперименте было использовано следующее лабораторное оборудование: весы аналитические и технические, ламинарный бокс, сушильный шкаф, автоклав, термостат, световые стенды, стаканы химические, мерные цилиндры, колбы со шлифом для хранения маточных растворов, мерные пипетки, чашки Петри, стаканы для выращивания стерильных растений, фольга, вата, фильтровальная бумага, химреактивы (для приготовления питательных сред), пинцеты, скальпели, корнцанги, спиртовка.

Опыты проводили в стерильном помещении, оборудованном ламинарным боксом. Инструменты, посуду, питательные среды и материалы стерилизовали. За 10–20 минут до начала работы бокс облучали бактерицидными ультрафиолетовыми лампами. В ламинарном боксе располагали спиртовку, спички, стакан или цилиндр с 96%-ным этиловым спиртом. Всю внутреннюю поверхность ламинарного бокса, спиртовку, колбы с питательной средой обрабатывали 70%-ным этиловым спиртом.

Всю посуду, которую использовали в работе, тщательно промывали с использованием детергентов. Вымытую посуду трижды прополаскивали дистиллированной водой и высушивали в сушильном шкафу. Посуду стерилизовали в сухожаровом шкафу (SNOL 420/350) при температуре +120 °С в течение двух часов. В процессе работы все инструменты (пинцеты, скальпели, микробиологические петли) еще раз стерилизовали (после каждой операции) в ламинарном боксе 96%-ным этиловым спиртом с последующим трехкратным отжигом в пламени спиртовки.

В качестве эксплантов использовали этиолированные ростки клубней картофеля сортов «Вычегодский» и «Зырянец». Ростки предварительно промывали мыльным раствором в проточной воде. В качестве стерилизующих

агентов в работе использовали растворы этилового спирта, перекиси водорода и коммерческий продукт «Белизна», содержащий гипохлорит натрия в различных концентрациях. Время выдерживания эксплантов в стерилизующем растворе варьировалось от 5 до 20 минут.

В стерильных условиях в ламинар-боксе на поверхности стерильной чашки Петри у каждого этиолированного ростка удалялась обожженная при стерилизации часть, затем росток помещался в чашку Петри на агаризованную питательную среду.

Питательную среду для получения микрклонов и микрклонального размножения растений готовили по прописи Мурасиге – Скуга (МС) с модификацией по содержанию витаминов и фитогормонов (табл. 1). Питательные среды стерилизовали при 1 атм. в течение 20 мин [7].

Таблица 1

Составы питательных сред для культивирования растений-регенерантов картофеля сортов «Зырянец» и «Вычегодский»

Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л	Питательные среды				
		I	II	III	IV	V
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,0	+	+	+	+	+
KNO <sub>3</sub>	1900,0	+	+	+	+	+
CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O	440,0	+	+	+	+	+
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	370,0	+	+	+	+	+
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,0	+	+	+	+	+
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	+	+	+	+	+
MnSO <sub>4</sub> ×4H <sub>2</sub> O	22,3	+	+	+	+	+
CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O	0,025	+	+	+	+	+
CoCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	0,025	+	+	+	+	+
ZnSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	8,6	+	+	+	+	+
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O	0,25	+	+	+	+	+
KI	0,83	+	+	+	+	+
FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	27,8	+	+	+	+	+
Na <sub>2</sub> EDTA×2H <sub>2</sub> O	37,3	+	+	+	+	+
Мезоинозит	0,1	+	+	+	+	+
Тиамин-НCl	0,1	+	+	+	+	+
Пиридоксин-НCl	0,1	+	+	+	+	+
Аскорбиновая кислота	0,1	+	+	+	+	+
Никотиновая кислота	0,1	+	+	+	+	+
Фитогормоны		Концентрация мг/л				
БАП		0,2	1,0		1,0	
Кинетин		0,3		0,2		
НУК			0,5			
ИМК				0,2		
ИУК				1,0	0,5	

Растения-регенеранты в пробирках с агаризованной питательной средой МС культивировали на стендах при освещенности 4000 люкс, температуре 22 °С, в условиях 16-часового светового периода, влажности воздуха 50–70%.

## Результаты

Основным условием успешного получения микроклонов картофеля в условиях *in vitro* является стерилизация растительных эксплантов, поэтому нами был проведен подбор условий стерилизации: времени стерилизации; выбор подходящего стерилизующего агента и его концентрации с тем, чтобы не допустить повреждения тканей исходного растительного материала, но при этом избавиться от посторонней микрофлоры, способной заразить растения-регенеранты в условиях *in vitro*. Кроме того, стерилизующий агент должен был хорошо удаляться из растительных тканей при промывке стерильной дистиллированной водой. В этих целях для поверхностной стерилизации этилированных ростков картофеля нами была рекомендована их двухэтапная стерилизация 70%-ным раствором этилового спирта и 50%-ным раствором коммерческого препарата «Белизна» (гипохлорит натрия) в течение 15 мин с последующей трехкратной промывкой дистиллированной водой.

Чашки Петри с эксплантами на питательной среде помещали на полки в световой комнате при освещенности 4000 люкс для активации точек роста. Приблизительно к 20-му дню на экспланте сформировалось 2–3 зеленых побега, которые в стерильных условиях были отделены от экспланта и помещены на свежую питательную среду в пробирки высотой 25 см (рисунок 1). Для осуществления этой первой стадии микроклонального размножения нами были опробованы пять составов питательной среды МС, при этом для последующих экспериментов были рекомендованы среды II с добавлением БАП (1 мг/л) и НУК (0,5 мг/л) и V (безгормональная). На втором пассаже использовалась безгормональная (не содержащая гормонов) среда.

Следует отметить, что растения-регенеранты, полученные от разных сортов картофеля, отличались по скорости роста, начиная с первого пассажа. В условиях *in vitro* скорость роста побегов растений-регенерантов сорта «Вычегодский» была выше, чем сорта «Зырянец». Период роста побегов до высоты пробирок и готовности к следующему пассажиру занимал не более 20–25 дней.

Полученные при первом пассаже растения в ламинарном боксе извлекали из пробирок, отделяли от агаризованной питательной среды и промывали стерильной водой. Далее растения черенковали и каждый черенок помещали в отдельную пробирку со средой МС для второго пассирования. Начиная со второго пассажа, от каждого побега было получено до 7–10 нормально развитых отводков *in vitro*, что позволяет выразить надежду на достижение высоких коэффициентов мультипликации при последующих пассажах (рисунок).

На 25-й день у сформировавшихся растений периодически проводили измерение высоты побегов и подсчитывали число междоузлий. У сорта «Вычегодский» средняя высота растений-регенерантов составила 12 см; число междоузлий – 13 шт., у сорта Зырянец – 7,5 см и 9 шт. соответственно (рис. 1).

Таким образом, в данной работе был подобран состав питательных сред и получены клоны растений картофеля двух сортов местной селекции, отличающихся скоростью роста. Большой скоростью роста характеризуются растения-регенеранты сорта Вычегодский, меньшей – сорта Зырянец. В будущих исследованиях представляет также интерес использование биопрепаратов для стимулирования роста и мультипликации побегов растений-регенерантов в условиях *in vitro* и горшочной культуры.



Рис. 1. Формирование и рост побегов растений-регенерантов картофеля в культуре *in vitro*



### Заключение

На основании проделанной работы можно сделать следующие выводы:

1. Для стерилизации эксплантов и успешного введения в культуру растений картофеля сортов «Зырянец» и «Вычегодский» рекомендована двухэтапная стерилизация 70%-ным раствором этилового спирта и 50%-ным раствором коммерческого препарата «Белизна» в течение 15 мин с последующей промывкой дистиллированной водой.

2. Для выращивания растений-регенерантов опробовано пять составов питательной среды МС с различной концентрацией фитогормонов. Для последующих экспериментов рекомендованы среды II (с БАП, 1 мг/л); НУК, 0,5 мг/л) и V (безгормональная среда); на втором пассаже, после черенкования эффективно использование безгормональной среды.

3. На безгормональной среде МС (V) большей скоростью роста характеризуются растения-регенеранты сорта «Вычегодский», меньшей — сорта «Зырянец». В будущих исследованиях представляет также интерес использование биопрепаратов для стимулирования роста и мультипликации побегов растений-регенерантов в условиях *in vitro* и горшочной культуры.

*Исследования выполнены по теме НИР «Оценка реакции генотипов пищевых и кормовых растений, адаптированных к условиям Крайнего Севера, в целях создания новых высокопродуктивных сортов», Рег. № НИОКТР*

AAAA-A19-119031390055-1; № Гос. задания 0333-2019-0008-С-01.

### Литература

1. *Киргизова И.В.* Биотехнологические аспекты получения безвирусных сортов картофеля, устойчивых к вирусным заболеваниям методом микроклонального размножения // *Актуальная биотехнология.* — 2013. — № 4(7). — С. 18–21.
2. *Сафроновская Г.* Микроклональное размножение. Роль в повышении продуктивности и качества картофеля // *Наше сельское хозяйство.* — 2019. — № 15(215). — С. 90–93.
3. *Сулейманова Ш.С., Исаева В.К., Мусаева К.Э., Абдималикова А.А.* Микроклональное размножение картофеля черенкованием побегов // *Известия ВУЗов Кыргызстана.* — 2019. — № 2. — С. 37–42.
4. *Тулинов А.Г., Конкин П.И.* Оценка перспективных сортообразцов картофеля в условиях Республики Коми // *Земледелие.* — 2016. — № 8. — С. 45–47.
5. *Тулинов А.Г., Лобанов А.Ю., Шлык М.Ю., Косолапова Т.В.* Сорта картофеля, адаптированные к условиям Севера // *Картофель и овощи.* — 2019. — № 8. — С. 27–28.
6. *Чеботарев Н.Т., Юдин А.А., Конкин П.И., Микушева Е.Н.* Новые сорта и гибриды картофеля, рекомендованные для возделывания на севере // *Известия Самарского научного центра РАН.* — 2018. — № 2(4). — С. 772–775.
7. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Journal of Plant Physiology.* — 1968. — Vol. 15(13). — P. 473–497.

## MICROCLONAL PROPAGATION OF VALUABLE POTATO VARIETIES ADAPTED FOR CULTIVATION IN THE KOMI REPUBLIC (EUROPEAN NORTH-EAST OF RUSSIA)

S.O. VOLODINA<sup>1,2</sup>, N.N. SHERGINA<sup>1</sup>, V.V. VOLODIN<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*A.V. Zhuravsky Institute of Agrobiotechnologies, FRC Komi scientific center of UrD RAS,*

<sup>2</sup>*Institute of Biology, FRC Komi scientific center of UrD RAS, Syktyvkar*

Microclones and plant regenerants of two potato varieties «Vychegodskiy» and «Zyryanets» adapted for cultivation in the North are obtained. The Murashige — Skoog medium (II) with the addition of phytohormones BAP (1 mg/l) and NUC (0.5 mg/l) was optimal for obtaining microclones from etiolated potato sprouts. A hormone-free medium (V) was used for microclonal propagation of potato plants. It was found that plant regenerants obtained from different varieties of potatoes differed in their growth rate, starting from the first passage. The rate of growth shoots of plants-regenerants of the cultivar «Vychegodskiy» was higher than variety «Zyryanets». The period of shoots growth of the «Vychegodsky» cultivar to the top of test tubes (12 cm) and readiness for the next passage took no more than 20–25 days.

*Keywords:* potato, micropropagation, Northern varieties, «Vychegodskiy», «Zaryanets» North, nutrient medium.

## ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Е.В. ВАЛЕЕВА<sup>1,2\*</sup>, И.Х. ВАЛЕЕВА<sup>2</sup>, И.И. СЕМИНА<sup>2</sup>, Д.О. НИКИТИН<sup>2</sup>,  
А.Г. МУХАМЕДЖАНОВА<sup>1,3</sup>, Р.Д. МУХАМЕТШИНА<sup>1</sup>,  
А.Д. МУХАМЕТШИНА<sup>1</sup>, О.А. КРАВЦОВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет,

<sup>2</sup> Казанский государственный медицинский университет,

<sup>3</sup> ФГБНУ Федеральный центр токсикологической, радиационной  
и биологической безопасности ВНИВИ, Казань

В настоящем исследовании показано, что с возрастом у крыс контрольной группы не было зафиксировано изменений в уровне глюкозы. Концентрация глюкозы у человека изменяется под действием физических нагрузок. В группе с воздействием разного рода хронического стресса у 9-месячных крыс по сравнению с 6-месячными наблюдалась стрессовая гипергликемия. Концентрация глюкозы при ответе на 3-месячный хронический стресс у 9-месячных крыс существенно возросла. Активность креатинкиназы коррелирует с возрастом. Также выявлено, что только у активных самок 6 месяцев была значимо высокая активность лактатдегидрогеназы.

**Ключевые слова:** физическая нагрузка, хронический стресс, иммобилизация, глюкоза, креатинкиназа, лактатдегидрогеназа.

### Введение

По последним данным современных исследований, для снижения негативного влияния хронического стресса показаны умеренные физические нагрузки. В то же время профессиональные тренировки также могут рассматриваться как активный стресс, который может приводить к негативным последствиям [20]. Стресс — адаптивная или неадаптивная реакция на внешние или внутренние стимулы (триггеры), которые могут приводить к критическим нарушениям состояния организма [14]. Стресс провоцирует развитие многих заболеваний человека и ускоряет старение примерно на 9–17 лет [15]. Индивидов, имеющих низкий порог устойчивости к стрессу, относят к группе высокого риска развития многих психосоматических заболеваний под воздействием стрессорных факторов. К примеру, посттравматическое стрессовое расстройство, нейротизм,

депрессия могут привести к дисфункции органа (мозга и др.) или смерти (самоубийство, кароти и др.).

В спортивной деятельности стресс-факторы классифицируются на психологические (испытываемый стресс во время состязаний), физиологические (перетренированность), с разной продолжительностью и направленностью воздействия [1]. Изнуряющие физические нагрузки у высококвалифицированных спортсменов приводят к синдрому перетренированности. Данное состояние характеризуется недостаточным восстановлением после тренировок, пониженной работоспособностью и отсутствием оптимальных показателей нейрогуморальной регуляции [24].

Избыточные тренировочно-соревновательные нагрузки высокой интенсивности наряду с психологическим напряжением сравнимы с хроническим стрессом, вызывающим нарушение гомеостаза у человека. Динамика изменения уровня биохимических показателей или активности ферментов указывает на реакцию адаптации организма [6]. Выделяют ряд биохимических показателей, уровень или активность которых изменяется под действием физических нагрузок: уровень гемоглобина, уровень рН и лактата, количество общего белка, глюкозы, мочевины, ферментов (креатинфосфокиназы, аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы), ионов и гормонов [6].

© 2020 г. Валеева Е.В., Валеева И.Х., Семина И.И., Никитин Д.О., Мухамеджанова А.Г., Мухаметшина Р.Д., Мухаметшина А.Д., Кравцова О.А.

\* Автор для переписки:

Валеева Елена Валерьевна

аспирант кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии ИФМиБ КФУ, младший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории КГМУ

E-mail: vevaleeva@ya.ru

В большинстве случаев стресс в жизненно негативных ситуациях вызывает необратимые последствия в биохимических параметрах. Доказано, что краткосрочный стресс, равно как и ожирение, негативно воздействует на молекулярные механизмы в клетке, в том числе на теломеры [21]. В исследованиях, где измерялся уровень стресса у физически неактивных людей, показана отрицательная взаимосвязь с длиной теломер, а у физически активных людей такой же воспринимаемый стресс не влиял на длину этих структур [21].

В связи с этим целью настоящей работы является изучение влияния различного вида хронического стресса (многодневной иммобилизации, физической нагрузки и комбинированного комплекса данных воздействий) в динамике через 3 и 6 месяцев на биохимические показатели сыворотки на модели лабораторных животных — крыс линии Уистар.

## Материалы и методы

В лонгитюдном опыте участвовало 40 крыс (6 пометов) линии Уистар в возрасте от 6 месяцев до 12 месяцев (30 самцов, 10 самок). В начальной точке эксперимента ( $182 \pm 5$  дней) самцы весили  $433,3 \pm 30,5$  грамм, самки —  $331,9 \pm 86,3$  грамм.

До начала экспериментов все животные содержались в стандартных условиях с естественным световым режимом на полнорационной сбалансированной диете (ГОСТ Р50258-92) с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997). На проведение данного исследования получено разрешение Локального этического комитета Казанского федерального (Приволжского) университета (протокол № 20 от 27 декабря 2019 г.).

С целью моделирования разного типа методов хронического стресса было сформировано 4 группы крыс, в каждой из которой находились крысы с разным видом стрессорной реакции. В 1-ю группу входило 9 интактных животных, которые не подвергались никаким воздействиям (контрольная). 2-я группа — это крысы, подвергавшиеся тесту «Вынужденное плавание с грузом» ( $n=12$ ). Плавание проходило в водном лабиринте Морриса (OpenScience, Россия) с периодичностью каждый 4-й день в течение 6 мес. продолжительностью 7 минут с грузом 8% от массы тела [12]. У животных 3-й группы хронический стресс вызывался ежедневной 90-минутной иммобилизацией в специальном пенале-фиксаторе (OpenScience, Россия) в течение 14 дней ( $n=9$ ). По-

следняя 4-я группа включала в себя комплексную комбинацию тестов из 2-й и 3-й группы ( $n=10$ ). В случае, когда проводился тест «Вынужденное плавание с грузом», иммобилизацию крысам в этот день не осуществляли.

Для определения утомляемости животных использовались такие распространенные показатели в спорте: глюкоза как показатель энергетического субстрата, лактатдегидрогеназа (ЛДГ) и креатинкиназа (КК) — регуляторы обмена веществ. Для анализа этих биохимических параметров брали кровь натошак из хвостовой вены 3 раза: в начальной точке эксперимента ( $182 \pm 5$  дней), через 3 ( $289 \pm 6$  дней) и через 6 месяцев ( $394 \pm 5$  дней) воздействия разного типа стресса. Биохимический анализ проводили на мультиплексном анализаторе Lumineх с использованием коммерческого набора «Milliplex Map» (Дармштадт, Германия).

Статистическая обработка полученных данных проводилась с применением общепринятых методик при помощи программы GraphPad InStat. Оценивалась нормальность распределения, применялся парный t-критерий Стьюдента между показателями одних групп крыс в начальной точке, через 3 и 6 месяцев воздействия стресса, а также сравнение групп крыс проводилось с помощью двухвыборочного t-критерия для независимых выборок.

## Результаты

До воздействия стрессовых факторов при сравнении по половому признаку результатов биохимического анализа крыс разного возраста не было обнаружено различий в показателях концентрации глюкозы, общей активности КК и ЛДГ в сыворотке крови ( $p > 0,05$ ) (рис. 1): уровень глюкозы у самцов составлял  $5,0 \pm 1,6$  против самок  $4,5 \pm 1,2$  ммоль/л, активность КК у самцов  $377,3 \pm 201,3$  против самок  $418,5 \pm 144,6$  Е/л и активность ЛДГ составляла  $1099,6 \pm 559,9$  против  $1252,6 \pm 411,5$  Е/л, соответственно.

У крыс контрольной группы эксперимента с увеличением возраста не обнаружено изменений показателей глюкозы. В группе крыс с 3-месячной физической нагрузкой (плавание) относительно начальной точки уровень глюкозы был значимо выше на  $2,0$  ммоль/л ( $p=0,004$ ), в группе иммобилизации — выше на  $2,7$  ммоль/л ( $p=0,01$ ), в группе комбинации стрессового воздействия (плавание и иммобилизация) — выше на  $2,3$  ммоль/л ( $p=0,01$ ) (табл. 1). Значимо высокий показатель глюкозы у 9-месячных крыс по сравнению с 12-месячными в группе иммобилизации, а также в группе комбинации плавания и иммобилизации ( $p=0,02$  и  $p=0,004$ , соответственно) (см. табл. 1, рис. 2 А).

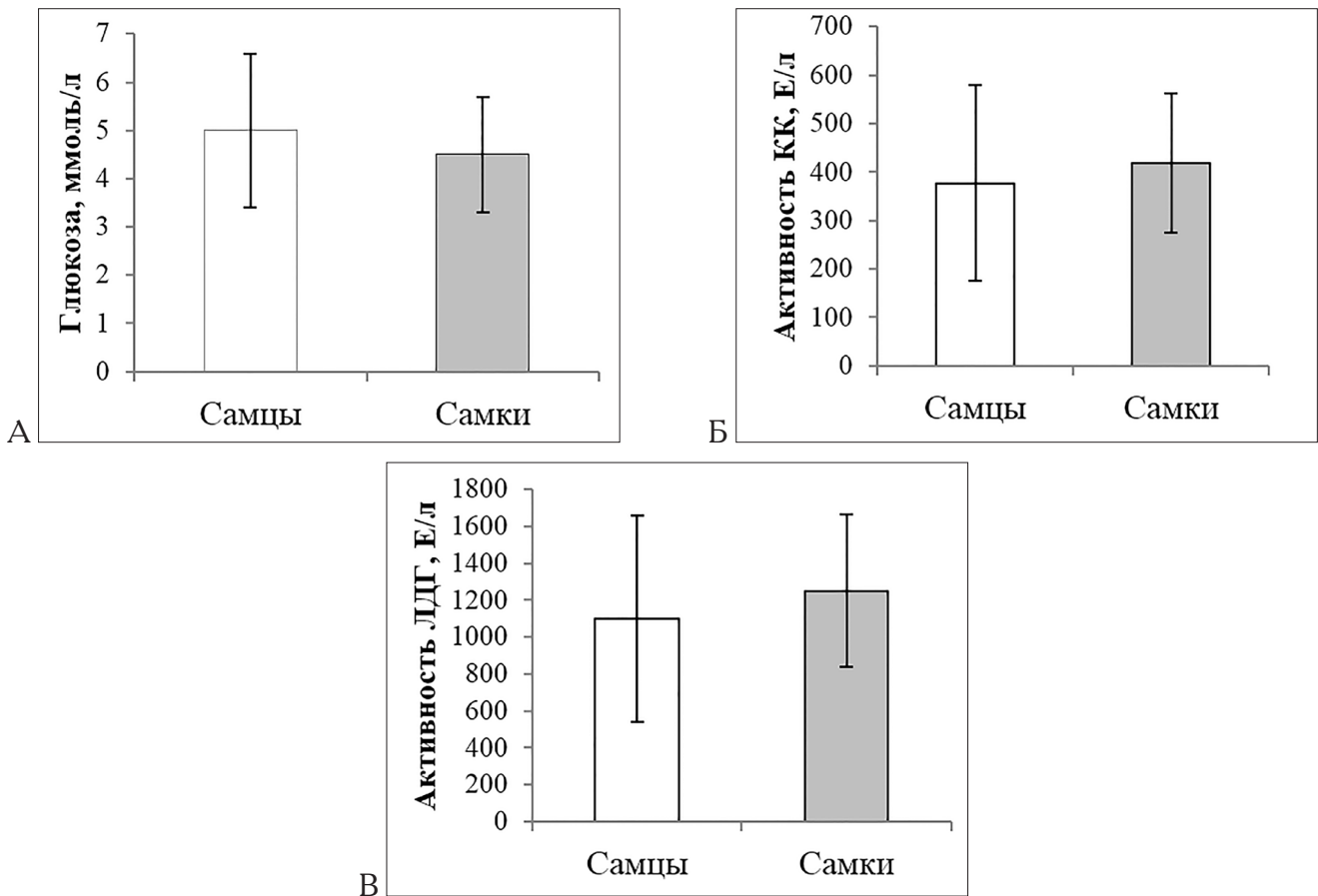


Рис. 1. Сравнительная диаграмма биохимических показателей в сыворотке крови в начальной точке у самцов и самок. По горизонтали — пол крыс, по вертикали — значения различных биохимических показателей: А — глюкоза, Б — активность креатинкиназы, В — активность лактатдегидрогеназы

При сравнении параметров крыс разных экспериментальных групп одного возраста обнаружено значимое отличие крыс в возрасте 9 месяцев: в контрольной группе уровень глюкозы значимо выше, чем в группе «Плавание и Иммобилизация» ( $5,7 \pm 1,2$  против  $6,8 \pm 1,5$  ммоль/л,  $p=0,01$ ). Через 6 месяцев опыта у крыс найдена разница между контрольной группой и группой с иммобилизацией: у опытной группы уровень глюкозы ниже ( $5,6 \pm 0,4$  против  $4,9 \pm 0,5$  ммоль/л,  $p=0,003$ ), аналогичный результат у группы «Плавание и Иммобилизация» относительно контрольной ( $5,6 \pm 0,4$  против  $7,7 \pm 0,7$  ммоль/л,  $p=0,005$ , соответственно) (см. табл. 1).

В ходе парного сравнения значимо изменялся уровень активности КК в контрольной группе во всех 3 точках измерения: по сравнению показателей группы начальной точки у крыс с 3-месячным воздействием стрессоров активность КК повышалась в 2 раза ( $p=0,04$ ), а у крыс с 6-месячным воздействием данный показатель оказался в 3,5 раза ниже ( $p=0,0012$  между 9 и 12 месяцами) (см. табл. 1). В группе «Плавание» через 6 месяцев у крыс также

этот показатель была значимо ниже по сравнению с 3-месячными изнурительными нагрузками ( $p=0,007$ ). В группе с иммобилизацией через 3 месяца активность КК был значимо ниже, чем у крыс; данный измеряемый показатель в начальной точке ( $p=0,008$ ) и выше, чем через 6 месяцев ( $p=0,0012$ ) (см. табл. 1).

При сравнении 9-месячных крыс опытной группы с контрольной значимая разница в активности КК зафиксирована между контрольной группой и группой с комплексом стрессовых воздействий (плавание и иммобилизация) ( $p=0,0009$ ). Обнаружено, что в опытной группе (плавание и иммобилизация) уровень активности КК значимо ниже контрольной группы ( $p=0,006$ ) (см. табл. 1, рис. 2 Б).

Дальнейшее сравнение показателей уровня активности ЛДГ не выявило значимых отличий между разными возрастными группами в каждой экспериментальной группе. При сравнительном анализе исследуемых групп с контрольной значимо высокий уровень активности ЛДГ был обнаружен в группе 12-месячных крыс «Плавание и Иммобилизация» ( $p=0,006$ ) (см. табл. 1, рис. 2 В).

**Биохимические параметры крыс в возрастной динамике**

Группы	Контрольная группа (n=9)			Плавание (n=12)			Иммобилизация (n=9)			Плавание + Иммобилизация (n=10)		
	нач. точка	ч/з 3 мес.	ч/з 6 мес.	нач. точка	ч/з 3 мес.	ч/з 6 мес.	нач. точка	ч/з 3 мес.	ч/з 6 мес.	нач. точка	ч/з 3 мес.	ч/з 6 мес.
Глюкоза, ммоль/л	6,2±2,0	5,7±1,2	5,6±0,4	4,4±1,0 <sup>#</sup>	6,4±2,2	5,5±1,1	4,6±1,5 <sup>+</sup>	7,3±2,5	4,9±0,5 <sup>++</sup>	4,5±0,7 <sup>§</sup>	6,8±1,5	4,7±0,7 <sup>§§</sup>
Активность КК, Е/л	252,8±177,4*	505,3±166,1	72,3±57,7**	426,3±204,8	530,1±224,3	116,1±69,4 <sup>##</sup>	453,3±133,1 <sup>+++</sup>	372,9±111,9 <sup>++++</sup>	117,1±53,0	392,5±183,3	243,2±114,7	222,2±132,2
Активность ЛДГ, Е/л	973,2±676,0	1034,7±578,6	863,7±476,7	1203,8±404,1	978,3±753,2	1214,2±462,6	1417,8±664,7	1275,9±527,0	1160,9±398,8	1019,8±414,1	1048,7±605,8	1341,2±328,0

*Примечание:* Начальная точка — показатели до начала проводимых опытов, ч/з 3 мес. и ч/з 6 мес. — через 3 и 6 месяцев проводимых опытов, соответственно; значимые изменения внутри контрольной группы: \* —  $p=0,037$  между 6 и 9 мес., \*\* —  $p=0,0012$  между 9 и 12 мес.; значимые изменения в группе «Плавание»: # —  $p=0,004$  между 6 и 9 мес., ## —  $p=0,007$  между 9 и 12 мес.; значимые изменения в группе «Иммобилизации»: + —  $p=0,01$  между 6 и 9 мес., ++ —  $p=0,02$  между 9 и 12 мес., +++ —  $p=0,0075$  между 6 и 9 мес., ++++ —  $p=0,0012$  между 9 и 12 мес.; значимые изменения в группе «Плавание и Иммобилизация»: § —  $p=0,01$  между 6 и 9 мес., §§ —  $p=0,004$  между 9 и 12 мес.

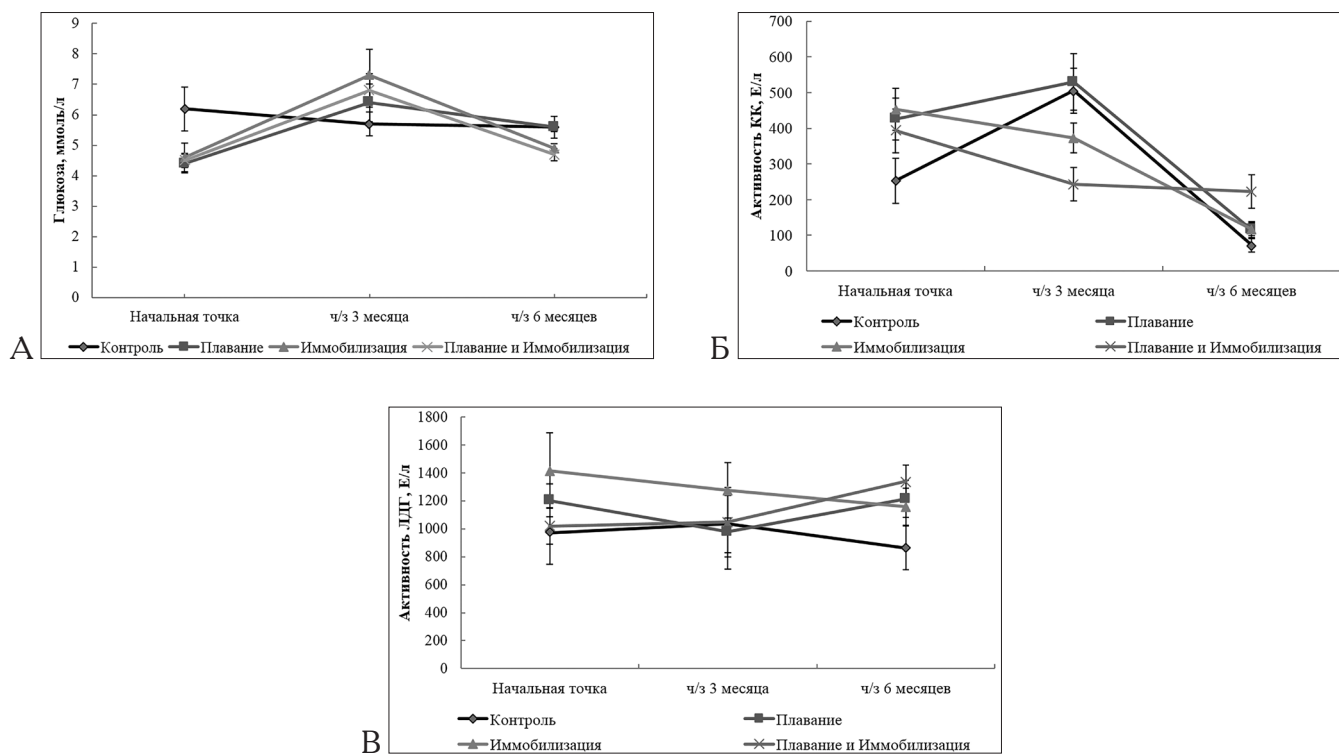


Рис. 2. Изменения биохимических параметров вследствие воздействия хронического стресса. По горизонтали — начальная точка: это показатели до начала проводимых опытов, ч/з 3 месяца и ч/з 6 месяцев: это через 3 и 6 месяцев проводимых опытов, соответственно

**Обсуждение**

В настоящем исследовании установлено, что с возрастом у животных контрольной группы не было зафиксировано изменений в уровне глюкозы. Данные различия в концентрации базальной глюкозы не подтверждают свидетельство о существующей разнице между воз-

растом. Хотя некоторые работы демонстрируют, что с возрастом уменьшается толерантность к глюкозе [10]. В работе Houtkooper R. H. et al. было показано, что с возрастом увеличивается концентрация глюкозы в мышцах и печени у мышей, причиной чего является нарушение метаболизма глюкозы и жирных кислот, окислительно-восстановительного гомеостаза в данных органах [18].

Концентрация глюкозы у человека изменяется под действием физических нагрузок. Известно, что длительные физические нагрузки приводят к снижению уровня глюкозы: у нетренированных людей снижение концентрации глюкозы более выражено. Повышенное содержание глюкозы в крови свидетельствует об интенсивном распаде гликогена печени либо относительно малом использовании глюкозы тканями, а пониженное ее содержание — об исчерпании запасов гликогена печени либо интенсивном использовании глюкозы тканями организма [7]. В случае воздействия разных моделей хронического стресса (социальный стресс, многодневная иммобилизация) наблюдается гипергликемия у животных по причине торможения транспорта глюкозы [3, 8].

В группе с воздействием разного рода хронического стресса у 9-месячных по сравнению с 6-месячными животными наблюдалась стрессовая гипергликемия ( $p < 0,05$ ). Однако по прошествии 3 месяцев у экспериментальной группы 12-месячных крыс наблюдалась дальнейшая адаптация к стрессу, поскольку уровень глюкозы снижался. Стоит заметить, что пониженный уровень глюкозы был выше исходного уровня в возрасте 6 месяцев во всех экспериментальных группах, исключая контрольную группу. Так, эти результаты лишь подтверждают потенциальное значение измерения уровня глюкозы в сыворотке для оценки интенсивности неблагоприятного стресса, воздействующего на организм [17, 23].

Разницы в показателях концентрации глюкозы между самками и самцами разного возраста не было замечено ( $p > 0,05$ ). Ранее было обнаружено, что у самцов уровень транскриптов глюкозных транспортеров (GLUT), отвечающих за перенос глюкозы через гемато-энцефалический барьер к клеткам мозга, повышается с возрастом, в то время у крыс женского пола рост экспрессии GLUT не наблюдался [19]. Половой диморфизм уровня мРНК GLUT характеризуется разной регуляцией гормонального фона [22]. Экстраполируя эти результаты на людей, исследования Груздева О.В. и др. на большой выборке показали, что между мужчинами и женщинами эта разница также существует, в частности, в возрасте 21—30 лет и 41—50 лет [2]. Половое различие в гомеостазе глюкозы связывают с различной физической подготовкой (набор мышечной массы, метаболические затраты), а также с циркулирующими эстрогенами [22]. Хотя также имеются работы, где не было найдено в исходном состоянии разницы между полами у мелких животных [9].

Концентрация глюкозы при ответе на 3-месячный хронический стресс у 9-месячных крыс существенно возрасла: в группе с постоянной физической нагрузкой разница была выше ( $2,0 \pm 1,2$  ммоль/л,  $p = 0,004$ ), чем в эксперименте с иммобилизацией ( $2,7 \pm 1,0$  ммоль/л,  $p = 0,01$ ) и комплексе воздействий на животных ( $2,3 \pm 0,8$  ммоль/л,  $p = 0,01$ ). Следовательно, при длительном хроническом стрессе организм животного рационально мобилизует работу углеводного ресурса и обеспечивает клетки энергией. Также можно предположить, что разница при комплексе стрессовых воздействий (плавание и иммобилизация) физическая нагрузка компенсаторно восполняет потребность глюкозы при многодневной иммобилизации.

Измерение активности в плазме ферментов креатинкиназы и лактатдегидрогеназы у спортсменов представляет некий диагностический скрининг микроповреждений мышечной ткани. Повышение активности данных ферментов в плазме отражает значительное изменение проницаемости мембранных структур миоцита, вплоть до его полного разрушения. Этот факт отражает адаптацию организма спортсмена к физической нагрузке высокой интенсивности [7]. При хроническом стрессе активность КК и ЛДГ повышена, что демонстрирует истощение организма, по аналогии с изнуряющими физическими нагрузками на организм [13].

С возрастом активность КК у контрольной группы повышалась на 100% у 9-месячных крыс и снижалась на 72% у 12-месячных относительно животных возрастом 6 месяцев. В группе «Плавание» у 9-месячных активность КК повышалась на 24%, у 12-месячных снижалась на 73%. В группе иммобилизации у 9-месячных животных активность КК постепенно снижалась на 18% и далее на 74%. В группе плавание + иммобилизация тоже она снижалась на 38% и далее на 43%. Исходя из полученных в настоящей работе результатов, активность креатинкиназы коррелирует с возрастом. Многие другие исследования, как и данный эксперимент, лишь подтверждают ранее сказанное [25]. Было продемонстрировано в эксперименте, что активность КК возрастает как у самок, так и у самцов в возрасте полового созревания в мышцах и в сыворотке, а также при беременности и в постменопаузе у женщин [16].

В собственном исследовании также выявлено, что только у активных самок 6 месяцев была значимо высокая активность ЛДГ. У животных активного типа выражено преобладание симпатoadренальной системы, при активации которой происходит выброс адреналина. Этот надпочечниковый гормон обеспечивает реакцию

«борьбы или бегства». У крыс с пассивно-оборонительным типом реакции в ответ на стресс происходит активация гипоталамо-гипофизарной системы с преобладанием выброса кортикостерона, обеспечивающего у них реакцию «затаивания» [4]. Можно предположить, что активный тип поведения, подразумевающий под собой энергозатратную физическую стратегию поведения, приводит к повышенной активности фермента КК и ЛДГ у молодых самок [11].

### Заключение

Таким образом, в ходе проведенного биохимического анализа и поведенческих тестов с исследованием разного рода хронического стресса на экспериментальной модели было установлено, что такие показатели, как активность КК, ЛДГ и уровень глюкозы в сыворотке, подходят в качестве биомаркеров адаптационных изменений в организме спортсменов и лиц, непрофессионально занимающихся спортом.

Дальнейшее изучение корреляции биохимических параметров с показателями нейроэндокринной системы (кортизол, пролактин, тестостерон) при разном типе хронического стресса, в том числе под воздействием изнурительных физических упражнений, раскроет пути и механизм регуляции гомеостаза организма, в частности гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы [5].

Данная работа поддержана грантом РФФИ 19-34-90171.

### Литература

1. *Абрамова В.В., Иванькова Ю.А.* Пути преодоления стресса спортсменами в спортивной соревновательной деятельности // Научный результат. Педагогика и психология образования. — 2016. — Т. 2. — № 4(10). — С. 70–76.
2. *Груздева О.В., Паличева Е.И., Максимов С.А., Жилиева Т.П., Дылева Ю.А., Макаров С.А.* Гендерные и возрастные особенности концентрации в крови глюкозы и общего холестерина как факторы риска заболеваний сердечно-сосудистой системы по результатам диспансеризации // Лабораторная служба. — 2016. — Т. 5. — № 2. — С. 15–21.
3. *Гурская А.И., Отвалко Е.А., Яцковская Н.М., Чиркин А.А.* Биохимические критерии острого и хронического стресса при иммобилизации крыс // Веснік ВДУ. — 2018. — № 2. — С. 61–65.
4. *Жуков Д.А.* Биологические основы поведения. Гуморальные механизмы. Учебник для студентов небиологических специальностей. — СПб.: Юридический центр Пресс, 2004. — 540 с.
5. *Кубасов Р.В.* Гормональные изменения в ответ на экстремальные факторы внешней среды // Вестник Российской академии медицинских наук. — 2014. — Т. 69. — № 9–10. — С. 102–109.
6. *Лопатина А.Б.* Теоретические аспекты изменения биохимических показателей крови организма спортсменов как показатель адаптационных процессов // Педагогико-психологические и медико-биологические проблемы физической культуры и спорта. — 2014. — № 2(31). — С. 117–122.
7. *Никулин Б.А., Родионова И.И.* Биохимические маркеры утомления и восстановления после физической нагрузки. — 2009 [Электронный ресурс] URL: <http://www.vera-lab.ru/info/49.html>.
8. *Сусликова М.И., Мирошниченко И.А., Корытов Л.И., Губина М.И.* Закономерности изменения скорости всасывания глюкозы в тонком кишечнике при иммобилизационном стрессе (экспериментальное исследование) // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). — 2010. — Т. 92. — № 1. — С. 36–38.
9. *Феофанова Н.А., Яковлева Т.В., Макарова Е.Н., Бажан Н.М.* Половые различия в экспрессии мышечных генов, вовлеченных в окисление липидов и захват глюкозы, у голодавших мышей // Вавиловский журнал генетики и селекции. — 2019. — Т. 23. — № 1. — С. 62–66.
10. *Arslanian S., Kim J.Y., Nasr A., Bacha F., Tfayli H., Lee S., Toledo F.G.* Insulin sensitivity across the lifespan from obese adolescents to obese adults with impaired glucose tolerance: Who is worse off? // Pediatric Diabetes. — 2018. — Vol. 19. — No. 2. — P. 205–211.
11. *Banfi G., Colombini A., Lombardi G., Lubkowska A.* Metabolic markers in sports medicine // Advances in Clinical Chemistry. — 2012. — Vol. 56. — P. 1–54.
12. *Beaton J.R., Feleki V.* Effect of diet and water temperature on exhaustion time of swimming rats // Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. — 1967. — Vol. 45(2). — P. 360–363.
13. *Bhatia N., Jaggi A.S., Singh N., Anand P., Dhawan R.* Adaptogenic potential of curcumin in experimental chronic stress and chronic unpredictable stress-induced memory deficits and alterations in functional homeostasis // Journal of Natural Medicines. — 2011. — Vol. 65(3–4). — P. 532–543.
14. *Dohrenwend B.S., Dohrenwend B.P.* Stressful life events: Their nature and effects. — John Wiley & Sons, 1974.
15. *Epel E.S., Blackburn E.H., Lin J., Dhabhar F.S., Adler N.E., Morrow J.D., Cawthon R.M.* Accelerated telomere shortening in response to life stress // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2004. — Vol. 101. — No. 49. — P. 1731–17315.
16. *Fukutake T., Hattori T.* Normalization of creatine kinase level during pregnancy in idiopathic hyperCKemia // Clinical Neurology and Neurosurgery. — 2001. — Vol. 103. — No. 3. — P. 168–170.

17. *Harcourt-Brown F.M., Harcourt-Brown S.* Clinical value of blood glucose measurement in pet rabbits // *Veterinary Record*. – 2012. – Vol. 170. – No. 26. – P. 674–674.
18. *Houtkooper R.H., Argmann C., Houten S.M., Cantó C., Jeninga E.H., Andreux P.A., Thomas C., Doenlen R., Schoonjans K., Auwerx J.* The metabolic footprint of aging in mice // *Scientific Reports*. – 2011. – Vol. 1. – Art. 134. doi: 10.1038/srep00134.
19. *Kelly S.D., Harrell C.S., Neigh G.N.* Chronic stress modulates regional cerebral glucose transporter expression in an age-specific and sexually-dimorphic manner // *Physiology & Behavior*. – 2014. – Vol. 126. – P. 39–49.
20. *Lincoln K.D.* Social stress, obesity, and depression among women: clarifying the role of physical activity // *Ethnicity & Health*. – 2019. – Vol. 24. – No. 6. – P. 662–678.
21. *Mathur M.B., Epel E., Kind S., Desai M., Parks C.G., Sandler D.P., Khazeni N.* Perceived stress and telomere length: a systematic review, meta-analysis, and methodologic considerations for advancing the field // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2016. – Vol. 54. – P. 158–169.
22. *Mauvais-Jarvis F.* Gender differences in glucose homeostasis and diabetes // *Physiology & Behavior*. – 2018. – Vol. 187. – P. 20–23.
23. *Rostamkhani F., Zardooz H., Zahediasl S., Farrokhi B.* Comparison of the effects of acute and chronic psychological stress on metabolic features in rats // *Journal of Zhejiang University Science B*. – 2012. – Vol. 13. – No. 11. – P. 904–912.
24. *Smith L.L.* Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress // *Med. Sci. Sport Exerc.* – 2000. – Vol. 32. – No. 2. – P. 317–331.
25. *Sumien N., Shetty R.A., Gonzales E.B.* Creatine, creatine kinase, and aging // *Subcell Biochem.* – 2018. – Vol. 90. – P. 145–168. doi: 10.1007/978-981-13-2835-0\_6.

## THE EFFECT OF CHRONIC STRESS ON BIOCHEMICAL PARAMETERS IN RATS OF DIFFERENT AGES

E.V. VALEEVA<sup>1,2</sup>, I.Kh. VALEEVA<sup>2</sup>, I.I. SEMINA<sup>2</sup>, D.O. NIKITIN<sup>2</sup>, A.G. MUKHAMEDZHANOVA<sup>1,3</sup>,  
R.D. MUKHAMETSHINA<sup>1</sup>, A.D. MUKHAMETSHINA<sup>1</sup>, O.A. KRAVTSOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Kazan (Volga Region) Federal University,*

<sup>2</sup> *Kazan State Medical University,*

<sup>3</sup> *Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological safety VNIVI, Kazan*

In the present study, it was shown that no changes in the level of glucose were recorded in the rats of the control group with age. The concentration of glucose in humans changes under the influence of physical activity. In the group exposed to various kinds of chronic stress, stress hyperglycemia was observed in 9-month-old rats compared to 6-month-old rats. The glucose concentration in response to 3-month-old chronic stress in 9-month-old rats increased significantly. The activity of creatine kinase correlates with age. It was also revealed that only active 6-month-old females had a significantly high activity of lactate dehydrogenase.

*Keywords:* physical activity, chronic stress, immobilization, glucose, creatine kinase, lactate dehydrogenase.



УДК: 579.843.1:612.017.4:57.083.3

## ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОСТАНОВКИ ПРЯМОГО ВАРИАНТА ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА

О.А. ЯКУШЕВА\*, Л.П. АЛЕКСЕЕВ, И.В. АРХАНГЕЛЬСКАЯ,  
В.Д. КРУГЛИКОВ, В.П. ЗЮЗИНА, М.Э. ЯГОВКИН

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

В результате проведенных исследований установлены оптимальные параметры и условия постановки прямого варианта дот-ИФА на основе поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов для детекции холерного токсина. Вначале проводится сенсibilизация НЦМ (Bio-Rad) супернатантами токсигенных и нетоксигенных холерных вибрионов (разведение 1:2) в 0,01 М буферном растворе ФосСБ рН 7,4 в условиях термостата — 10 минут, при комнатной температуре — 20 минут. Затем следует блокирование свободных сайтов связывания буферным раствором с 1% обезжиренного молока, время экспозиции с поли- и моноклональными пероксидазными конъюгатами 20 мин. при 37 °С и 50 мин. при комнатной температуре. Продолжительность взаимодействия с субстратной смесью — 2 минуты. Оптимизированный вариант дот-ИФА дает возможность сократить время проведения анализа до 90 минут при использовании термостата, а без приборного обеспечения его продолжительность составляет 120 минут.

*Ключевые слова:* холерный токсин, дот-иммуноанализ, поликлональные пероксидазные конъюгаты, моноклональные пероксидазные конъюгаты.

### Введение

Для оценки токсигенности холерных вибрионов O1, O139 серогрупп и эпидемической значимости выделенных штаммов в лабораторной практике одновременно используют иммунологические методы и молекулярно-генетические, поскольку применение последних, несмотря на их высокую чувствительность и специфичность, имеет ряд ограничений. Иммунологические методы исследования в силу своей высокой чувствительности и специфичности, относительной методической простоты и невысокой себестоимости являются эффективным способом решения задач детекции холерного токсина (ХТ) [1].

Одним из перспективных методов выявления ХТ служит точечная иммуноферментная реакция (дот-ИФА, иммунодот, dot-ELISA). Дот-ИФА отвечает ряду требований, предъявляемых к клиническим анализам: высокая чувствительность, минимальный объем образца, использование ограниченного участка полимерного листового материала, обладающего в 80–120 раз большей сорбционной

емкостью, чем полистирол, поливинилхлорид, акрилекс, применяемые в различных твердофазных иммунотестах, а также минимальный расход реагентов, минимальное количество стадий, выполняемых вручную, что снижает погрешности и сокращает время определения. Кроме того, для проведения дот-ИФА можно обойтись без технического оснащения, что особенно привлекательно и удобно при проведении массовых серологических исследований в полевых условиях [4].

Принцип реакции дот-ИФА состоит в том, что образцы антигена или антител наносят на полимерный материал и после высушивания обрабатывают раствором балластного белка для блокирования оставшихся свободными сайтами связывания, затем проводят иммунное проявление и визуализацию образующегося комплекса антиген-антитело.

Современные подходы к разработке и совершенствованию иммунодиагностических реагентов для выявления ХТ методом дот-ИФА базируются на широком использовании поли- и моноклональных антител заданной специфичности, и их применение в этом направлении нашло отражение в отечественных и зарубежных публикациях [6, 7, 10].

В Ростовском-на-Дону противочумном институте на основании поли- и моноклональных антител разработаны пероксидазные конъюгаты для детекции ХТ в прямом варианте дот-ИФА [2, 5].

© 2020 г. Якушева О.А., Алексеев Л.П., Архангельская И.В., Кругликов В.Д., Зюзина В.П., Яговкин М.Э.

\* **Автор для переписки:**

Якушева Ольга Александровна

научный сотрудник лаборатории гибридом, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

E-mail: yakusheva\_oa@antiplague.ru

Цель работы — оптимизировать условия постановки прямого варианта дот-ИФА для детекции ХТ на основе поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов.

### Материалы и методы

Для постановки дот-ИФА использовали нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ) с диаметром пор 0,45 мкм (Bio-Rad), диаметром пор 0,22 мкм (Merck Millipore) и диаметром пор 0,22 мкм (Технофильтр). Для удобства проведения реакции НЦМ делили карандашом на квадраты 5×5 мм. Все манипуляции проводили с помощью анатомического пинцета, не касаясь мембраны руками. Мембрану сенсibilизировали объемом 5 мкл/точку и выдерживали до полного высушивания. В качестве источника токсина использовали супернатанты токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 El Tor и *V. cholerae* O139, положительным контролем служил препарат очищенного ХТ [1], а отрицательным контролем — среда АК1 и супернатанты нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor. Супернатанты холерных вибрионов и гетерологичных микроорганизмов получали после выращивания штаммов холерных вибрионов в среде АК1 по стандартному методу М. Iwanaga [9]. Бактериальную массу обеззараживали мертиолятом натрия (1:10000), выдерживали сутки в холодильнике, после чего делали трехкратные высевы на специфическую стерильность. Обеззараженную бактериальную массу осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 8000 об./мин.

Разведения токсина и токсинсодержащих образцов готовили в буферных растворах: 0,01 М карбонат-бикарбонатный (КББ), рН 9,5; 0,01 М боратный (ББР), рН 8,0; 0,01 М фосфатно-солевой (ФосСБ), рН 7,4.

Процедуру блокирования свободных от иммунореагентов участков НЦМ проводили в течение 20 минут с применением блокирующих агентов: бычий сывороточный альбумин, обезжиренное молоко, желатин в концентрациях 2%, 1% и полиэтиленгликоль (мол. масса 20000) в концентрациях 0,5%, 0,25%.

Отмывку мембран осуществляли 0,015 М фосфатным буфером рН 7,4 (ФосСБ) или 0,015 М фосфатным буфером рН 7,4, содержащим 0,05% твина-20 (ФосСБТ).

Нанесение растворов конъюгата и субстратной смеси на НЦМ проводили в двух вариантах: точечным во влажной камере и погружением в субстратную смесь рН 5,0. Последняя содержала 3,3-диаминобензидин (Aldrich), 0,17 М лимонную кислоту, 0,35 М натриевую соль лимонной кислоты и 0,2% гидроперита (в пересчете на перекись водорода).

Объемы и время нанесения/погружения реагентов определяли экспериментально. После проявления пятен реакцию останавливали промыванием мембраны в дистиллированной воде. Учет результатов проводили визуально по наличию или отсутствию коричневых пятен. Результат считали отрицательным, если на месте нанесения пятна не проявлялось или выглядело как светло-бежевое фоновое окрашивание. Учитывали реакцию как положительную при появлении темно-коричневого или коричневого пятна с четким контуром.

ГМ<sub>1</sub>ИФА проводили по общепринятой методике [11].

Все исследования проводили не менее чем в трех повторностях.

### Результаты

При постановке дот-ИФА применяют различные твердофазные пористые носители, но чаще всего используют НЦМ, так как она проста в обращении и обладает высокими сорбционными свойствами для белков [6]. В связи с этим первый этап нашей работы включал оценку критерия сигнал/фон на НЦМ разных фирм производителей, потенциально пригодных для постановки дот-ИФА.

Вначале определяли фоновое окрашивание трех марок НЦМ, которую нарезали полосками и погружали в раствор субстратной смеси с красителем на 10 минут, ополаскивали водой, подсушивали на воздухе и визуально учитывали результат (рис. 1).

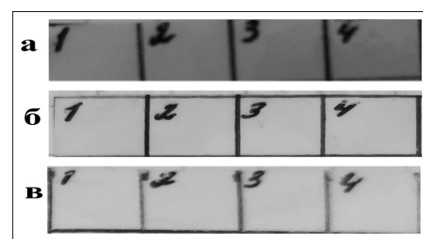


Рис. 1. Результат совместной инкубации НЦМ и субстратной смеси, содержащей краситель. а — НЦМ (Технофильтр); б — НЦМ (Merck Millipore); в — НЦМ (Bio-Rad)

Как видно на рисунке 1, окрашивание было зафиксировано на НЦМ (Технофильтр) после обработки субстратной смесью и сопровождалось появлением коричневого фона, в случае НЦМ (Merck Millipore) фон был едва заметный, а полностью он отсутствовал на НЦМ (Bio-Rad). В дальнейшем НЦМ с фоновым окрашиванием не использовали для постановки дот-иммуноанализа.

Важно отметить, что оптимальные условия сорбции и сохранение биологической активности антигена зависят от химического состава растворов, применяемых для разведения образцов, и их подбор осуществляется экспериментально. Иммунизация антигена происходит путем пассивной адсорбции белка на НЦМ в щелочных буферах в результате гидрофобных взаимодействий между нитроцеллюлозными и неполярными белковыми остатками [3]. Испытуемые препараты разводили в 0,01 М буферных растворах: ФосСБ рН 7,4; ББР рН 8,0; КББ рН 9,5 и наносили на НЦМ. Ранее нами было показано, что чувствительность прямого варианта дот-ИФА с поли- и моноклональными пероксидазными конъюгатами равняется 10 нг/мл; поэтому очищенный ХТ в дозе 10 нг/мл сорбировали на НЦМ, супернатанты холерных вибрионов сорбировали аналогично в разведении 1/2 [2, 5]. Эффективность сенсibilизации оценивали по интенсивности окрашивания пятен в местах нанесения токсинсодержащих образцов после выполнения дот-иммуноанализа.

Опытным путем было установлено, что сенсibilизация токсина наиболее эффективно происходит в 0,01 М фосфатном буферном растворе, рН 7,4 и сопровождается появлением коричневых пятен на НЦМ. Если использовали карбонатный и боратный буферные растворы интенсивность сигнала в виде окрашенного пятна значительно снижалась. Аналогичным образом оценивали продолжительность сорбции на НЦМ. Для этого сравнили два режима: токсин, нанесенный на НЦМ, выдерживали на воздухе при комнатной температуре ( $20 \pm 2$  °С) и мембраны с токсином инкубировали в условиях термостата (37 °С) в течение 10, 20, 30, 60 минут.

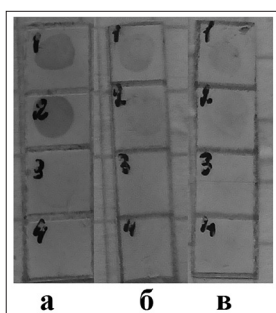


Рис. 2. Результаты сорбции токсинсодержащих препаратов на НЦМ, растворенных в 0,01 М буферных растворах. 1 – Холерный токсин 10 нг/мл; 2 – супернатант токсигенного штамма *V. cholerae* O1 El Tor; 3 – супернатант нетоксигенного штамма *V. cholerae* O1 El Tor; 4 – среда АКІ; а – 0,01 М фосфатно-солевой буфер (ФосСБ), рН 7,4; б – карбонат-бикарбонатный буфер (КББ), рН 9,5; в – 0,01 М боратный буфер (ББР), рН 8,0

Результаты экспериментов по обработке временных интервалов показали оптимальную сорбцию антигена на поверхности НЦМ в условиях термостата при 37 °С в течение 10 минут, тогда как при комнатной температуре процесс сенсibilизации занимал 20 минут.

Известно, что на качество иммуноферментного анализа влияют такие параметры, как состав блокирующего буферного раствора и концентрация его компонентов [3, 8]. Поэтому на следующем этапе нашей работы мы оценили наиболее часто применяемые блокирующие реагенты, такие как БСА, обезжиренное молоко, желатин, ПЭГ 20000. На рисунке 3 видно, что если НЦМ не подвергать блокированию соответствующими реагентами, то появляется интенсивный фон, обусловленный, вероятно, неспецифическим связыванием конъюгатов с мембраной. Неспецифическое фоновое окрашивание регистрируется и после обработки НЦМ полиэтиленгликолем во всех концентрациях. Также в обоих случаях отмечается ослабленный оптический сигнал, который не позволяет судить о характере иммунной реакции. Применение БСА в концентрациях 2%, 1% в реакции дот-ИФА полностью не исключало фоновое окрашивание. После обработки желатином в указанных концентрациях наблюдали реакцию, аналогичную БСА. Полное отсутствие фона установлено при использовании сухого обезжиренного молока в качестве блокирующего агента.

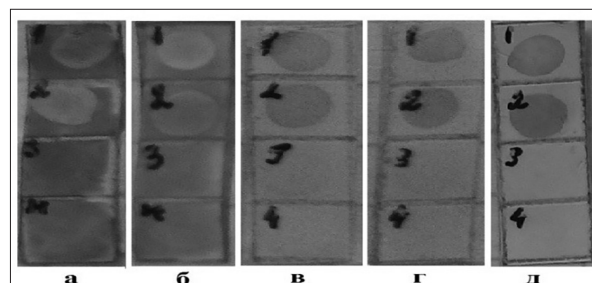


Рис. 3. Результаты блокирования свободных сайтов на НЦМ. 1 – Холерный токсин 10 нг/мл; 2 – супернатант токсигенного штамма *V. cholerae* O1 El Tor; 3 – супернатант нетоксигенного штамма *V. cholerae* O1 El Tor; 4 – среда АКІ; а – необработанная НЦМ; НЦМ после обработки: б – ПЭГ 20000, в – БСА, г – желатином, д – обезжиренным молоком

Наиболее часто используемыми промывочными буферами в иммуноферментном анализе являются фосфатный буфер рН 7,4 (ФосСБ) и фосфатный буфер (ФСБТ) рН 7,4, содержащий 0,05% твина-20 [3]. Однако на результаты реакции влияет не только химический состав промывочного буферного раствора, но и продолжительность и частота отмывания. В част-

ности, рекомендовано после сорбции антигена отмывать НЦМ не менее 3 раз по 5 минут, а после инкубации с ферментным конъюгатом — 6 раз по 5 минут [8]. Результаты наших исследований показали, что применение ФосСБТ для отмывания НЦМ с сенсibilизированными испытуемыми препаратами 3 раза по 5 минут и после инкубации с ферментным конъюгатом 6 раз по 5 минут не обеспечивает оптимального соотношения сигнал/фон и дает слабый оптический сигнал; поэтому мы использовали для отмывания ФосСБ. В итоге регистрировали отчетливые окрашенные пятна, позволяющие визуально учитывать результаты реакции. Сокращение стадий отмывания ФосСБ с 6 до 3 раз после инкубации с ферментным конъюгатом не приводило к повышению фонового окрашивания.

Значимым этапом работы является оптимизация условий связывания поли- и моноклонального пероксидазных конъюгатов с токсином. Акцент был сделан на определение минимального временного интервала совместной инкубации антигена с конъюгатом, исключающего понижение чувствительности реакции. Ранее нами были определены рабочие титры иммунопероксидазных конъюгатов для прямого варианта дот-ИФА, обеспечивающие четкую положительную реакцию. Конъюгаты на основе МКА имели рабочее разведение 1:32, а поликлональные соответственно 1:64 [2, 5]. В указанных разведениях поли- и моноклональные конъюгаты наносили точечно на НЦМ с сенсibilизированными на ней токсинсодержащими образцами и помещали во влажную камеру или полностью погружали в соответствующие растворы. Инкубацию проводили при комнатной температуре и в условиях термостата при 37 °С в течение 10, 20, 30, 40, 50 и 60 минут.

Опытным путем было установлено, что для эффективного специфического связывания поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов с токсинсодержащими препаратами при постановке прямого варианта дот-ИФА достаточно 20 минут при 37 °С. Вполне допустимо проведение реакции и в условиях комнатной температуры, но в этом случае время взаимодействия обоих конъюгатов увеличится до 50 минут. Аналогичные результаты были получены, когда конъюгаты наносили точечно.

На заключительном этапе дот-ИФА был осуществлен подбор оптимальных условий ферментативной реакции с субстратной смесью. Последнюю наносили точечно в объеме 5 мкл или в нее погружали НЦМ и инкубировали при комнатной температуре 2, 5 и 10 минут. Оказалось, что при полном погружении НЦМ

в субстратную смесь достаточно 2 минут для появления отчетливо окрашенных пятен на НЦМ, позволяющих визуально оценить результаты дот-ИФА. Точечное нанесение субстратной смеси обеспечивало сходные результаты.

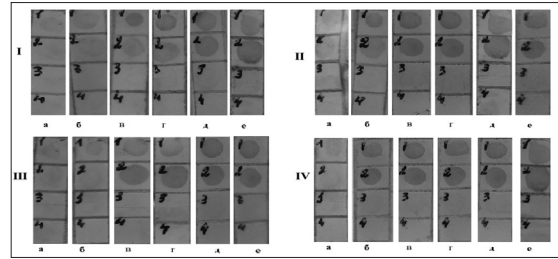


Рис. 4. Оптимизация условий связывания поли- и моноклонального пероксидазных конъюгатов с ХТ и определение минимального временного интервала инкубации. 1 — Холерный токсин 10 нг/мл; 2 — супернатант токсигенного штамма *V. cholerae* O1 El Tor; 3 — супернатант нетоксигенного штамма *V. cholerae* O1 El Tor; 4 — среда АК1; I — поликлональный пероксидазный конъюгат, при 20±2 °С; II — поликлональный пероксидазный конъюгат, при 37 °С; III — моноклональный пероксидазный конъюгат, при 20±2 °С; IV — моноклональный пероксидазный конъюгат, при 37 °С; временной интервал: а — 10 минут; б — 20 минут; в — 30 минут; г — 40 минут; д — 50 минут; е — 60 минут

Оптимизированный прямой вариант дот-ИФА для детекции ХТ апробировали на 30 супернатантах штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, 12 супернатантах *V. cholerae* O139, супернатантах гетерологичных микроорганизмов, а также супернатанте *Escherichia coli*, имеющей термолabile токсин, на 80% структурно сходный с ХТ. В качестве тест-системы сравнения использовали GM<sub>1</sub>ИФА, рекомендованный лабораториями ВОЗ и CDC.

Как следует из результатов, приведенных в таблице 1, ХТ был выявлен с помощью поликлонального пероксидазного конъюгата в прямом варианте дот-ИФА в 13 из 15 супернатантов токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, выделенных от человека, и у 8 из 10 супернатантов токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor водного происхождения. В то же время прямой вариант дот-ИФА на основе моноклонального пероксидазного конъюгата обеспечивал обнаружение ХТ у 11 из 15 штаммов *V. cholerae* O1 El Tor ctx<sup>+</sup>, выделенных от человека, и у 6 из 10 токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, выделенных из воды. В отношении нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor и *V. cholerae* O139 была зарегистрирована отрицательная реакция, что свидетельствует о специфичности использованных конъюгатов.

В то же время с помощью классического метода ГМ<sub>1</sub>-ИФА холерный токсин был определен в 14 из 15 супернатантов токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, выделенных от человека, и у 9 из 10 супернатантов токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor водного

происхождения. Отсутствие положительной реакции в дот-ИФА и ГМ<sub>1</sub>-ИФА с отдельными штаммами токсигенных холерных вибрионов, вероятно, обусловлено их длительным хранением в лиофилизированном состоянии, что отражается на продукции токсина.

Таблица 1

**Оценка диагностической эффективности прямого варианта дот-ИФА на основе поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов**

Штаммы	Кол-во штаммов	Источник выделения	дот-ИФА на основе		ГМ <sub>1</sub> -ИФА
			ПХ-ПКА	ПХ-МКА	
<i>Vibrio cholerae</i> O1 El Tor ctx <sup>+</sup>	15	человек	13	11	14
<i>Vibrio cholerae</i> O1 El Tor ctx <sup>+</sup>	10	вода	8	6	9
<i>Vibrio cholerae</i> O1 El Tor ctx <sup>-</sup>	5	вода	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> O139 ctx <sup>+</sup>	6	человек	4	5	5
<i>Vibrio cholerae</i> O139 ctx <sup>-</sup>	6	вода	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	1	-	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	1	-	-	-	-

### Заключение

В результате проведенных исследований установлены оптимальные параметры и условия постановки прямого варианта дот-ИФА на основе поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов для детекции холерного токсина: сенсibilизация НЦМ (Bio-Rad) супернатантами токсигенных и нетоксигенных холерных вибрионов (разведение 1:2) в 0,01 М буферном растворе ФосСБ рН 7,4 в условиях термостата – 10 минут, при комнатной температуре – 20 минут; блокирование свободных сайтов связывания буферным раствором с 1% обезжиренного молока, время экспозиции с поли- и моноклональными пероксидазными конъюгатами 20 мин. при 37 °С и 50 мин. при комнатной температуре; продолжительность взаимодействия с субстратной смесью 2 минуты. Оптимизированный вариант дот-ИФА позволяет сократить время проведения анализа до 90 минут при использовании термостата, а без приборного обеспечения его продолжительность составляет 120 минут.

В новой редакции руководства «Лабораторная диагностика холеры» предполагается исключить модель кроликов-сосунков для определения токсигенности холерных вибрионов. В такой ситуации решающее значение приобретают инвитровые методы детекции токсина. Из современных серологических методов диагностики ИФА является наиболее доступным и распространенным, по-

этому представляется перспективным внедрение его различных модификаций в практику. Экспрессной и экономически более выгодной модификацией является дот-ИФА, особенно его прямой вариант, отличающийся быстротой постановки, малым расходом испытуемых антигенов и других компонентов, визуальным учетом результатов.

Очевидно, что расширение спектра имеющихся методов за счет разработки новых, отвечающих современным диагностическим требованиям, способствует повышению качества лабораторных исследований на холеру, их точности и достоверности.

### Литература

1. Алексеева Л.П., Якушева О.А., Зюзина В.П., Дуванова О.В., Шипко Е.С., Писанов Р.В. Современные методические приемы очистки холерного токсина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2019. – Т. 15. – № 1. – С. 5–9.
2. Алексеева Л.П., Якушева О.А. Иммуноглобулиновые пероксидазные конъюгаты для детекции токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, O139 // Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии. – Ростов-на-Дону, 2019. – Вып. 32. – С. 186–189.
3. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. – М.: Высш. шк., 1991. – 288 с.
4. Маркина О.В., Алексеева Л.П., Телисманич Н.Р., Чемицова О.С., Акулова М.В., Маркин Н.В. ГМ<sub>1</sub>-дот-ИФА

- для выявления токсинпродуцирующих штаммов *Vibrio cholerae* // Клиническая лабораторная диагностика. — 2011. — № 5. — С. 49–52.
5. Якушева О.А., Алексеева Л.П., Зюзина В.П., Яговкин М.Э. Получение специфических поликлональных иммуоферментных конъюгатов для детекции холерного токсина // Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии. — Ростов-на-Дону, 2019. — Вып. 32. — С. 189–195.
  6. Якушева О.А., Алексеева Л.П., Писанов Р.В., Зюзина В.П., Яговкин М.Э., Дуванова О.В., Шипко Е.С. Получение антитоксических сывороток и возможность их применения в диагностике холеры // Вестник Пермского университета. Серия «Биология». — 2019. — Вып. 4. — С. 426–433.
  7. Bayat M., Khabiri A., Hemati B. Corrigendum to «Development of IgY-based sandwich ELISA as a robust tool for rapid detection and discrimination of toxigenic *Vibrio cholerae*» // Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. — 2019. doi: 10.1155/2019/4164982.
  8. Crowther John R. Molecular Biology Techniques, ELISA Guide. Second edition. — Humana Press, part of Springer Science + Business Media, LLC 2009.
  9. Iwanaga M., Kuyyakanond T. Large production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 in yeast extract peptone water // J. Clin. Microbiol. — 1987. — Vol. 25. — No. 1. — P. 2314–2316.
  10. Meza-Lucas A., Pérez-Villagómez M.F., Martínez-López J.P., García-Rodea R., Martínez-Castelán M.G., Escobar-Gutiérrez A., de-la-Rosa-Arana J.L., Villanueva-Zamudio A. Comparison of DOT-ELISA and standard-ELISA for detection of the *Vibrio cholerae* toxin in culture supernatants of bacteria isolated from human and environmental samples // Indian J. Microbiol. — 2016. — Vol.56. — No. 3. — P. 379–382.
  11. Sack D.A., Huda S., Neogi P.K., Daniel R.R., Spira W.M. Microtiter ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for *Vibrio* and *Escherichia coli* heat labile enterotoxins and antitoxins // J. Clin. Microbiol. — 1980. — Vol. 11. — No. 1. — P. 25–45.

#### Список сокращений

дот-ИФА — иммуоферментный анализ, осуществляемый на разных полимерных мембранах,  
 ХТ — холерный токсин,  
 НЦМ — нитроцеллюлозная мембрана,  
 КББ — карбонат-бикарбонатный буфер,  
 ББР — боратный буферный раствор,  
 БСА — бычий сывороточный альбумин,  
 ПЭГ — полиэтиленгликоль,  
 ФосСБ — фосфатно-солевой буфер,  
 ФСБТ — фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,05% твина-20,  
 ПХ-МКА — моноклональный пероксидазный конъюгат,  
 ПХ-ПКА — поликлональный пероксидазный конъюгат,  
 ГМ<sub>1</sub>ИФА — иммуоферментный анализ, при котором антиген улавливается ганглиозидами.

## OPTIMIZATION OF THE CONDITIONS FOR SETTING A DIRECT VARIANT OF DOT-IMMUNOASSAY FOR THE DETECTION OF CHOLERA TOXIN

O.A. YAKUSHEVA, L.P. ALEKSEEV, I.V. ARKHANGELSKAYA, V.D. KRUGLIKOV,  
 V.P. ZYUZINA, M.E. YAGOVKIN

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

As a result of the studies, the optimal parameters and conditions for setting the direct version of dot-ELISA based on poly- and monoclonal peroxidase conjugates for the detection of cholera toxin were established. First, nitrocellulose membrane (Bio-Rad) is sensitized with supernatants of toxigenic and nontoxigenic cholera vibrios (dilution 1:2) in 0.01 M buffer solution of PhosSB pH 7.4 in a thermostat for 10 minutes, at room temperature for 20 minutes. This is followed by blocking of free binding sites with a buffer solution with 1% skim milk, exposure time with poly- and monoclonal peroxidase conjugates 20 min. at 37 °C and 50 min. at room temperature. The duration of interaction with the substrate mixture is 2 minutes. The optimized version of dot-ELISA makes it possible to reduce the analysis time to 90 minutes when using a thermostat, and without instrumentation, its duration is 120 minutes.

*Keywords:* cholera toxin, dot-immunoassay, polyclonal peroxidase conjugates, monoclonal peroxidase conjugates.

## КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАСЩЕПЛЕНИЯ САХАРАЗЫ В ЭКСТРАКТЕ БИОМАССЫ *TRICHODERMA ATROBRUNNEUM* ВКПМ F-1434

А.В. ЛУШНИКОВ, И.А. ГНЕУШЕВА, И.Ю. СОЛОХИНА\*

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

Определены кинетические характеристики сахаразы экстракта биомассы *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434. Выявлен оптимальный температурный интервал 23–33 °С со средним значением удельной активности 245,99±2,4 мкмоль/мин×мг;  $C_v=0,99\%$ . Показано, что повышение температуры выше 38 °С снижает активность, и дальнейшее повышение температуры нецелесообразно. Оптимальные условия для ферментативной реакции в течение  $t=7$  минут, при  $T=28$  °С,  $pH=5,2$ ; среднее значение удельной активности 243,22±0,7 мкмоль/мин×мг. Подобранные параметры кинетики ферментации подтверждаются следующими показателями: расчеты скорости реакции при опытных температурах инкубации от 18–43 °С свидетельствуют, что энергия активации  $E_a$  изменяется незначительно в температурном оптимуме, который составляет 28 °С. Влияние концентрации субстрата на скорость реакции рассчитывали, используя уравнение Михаэлиса — Ментен, с помощью которого была установлена насыщающая концентрация сахарозы  $S=0,25$  моль/л.

**Ключевые слова:** *Trichoderma atrobrunneum*, сахароза, удельная активность, кинетика ферментативной реакции.

### Введение

Грибы *Trichoderma* встречаются во всем мире и присутствуют в разных географических регионах и климатических зонах. *Trichoderma* может быть выделен из воздуха, водоемов, почв, растений, животных и других грибов [9]. Грибы рода *Trichoderma* обладают целлюлозолитической и хитинолитической активностью, поэтому их часто используют для получения ферментов, разрушающих целлюлозу, лигнин, хитин и пектин [5, 6]. Хитинолитические и глюканолитические ферменты катализируют гидролиз клеточных стенок фитопатогенов, поскольку разрушают полимеры, не встречающиеся в растительных клетках [1].

Повышенный интерес к микроскопическим грибам рода *Trichoderma* связан с их практическим применением для получения биологически активных веществ, средств защиты растений и как активных деструкторов растительных полисахаридов. В настоящее время известно, что расщепление целлюлозы происходит под действием группы ферментов — целлюлаз, главными из которых являются эндоглюканаза, которая разрывает связи внутри

макромолекулы полимера, экзоглюканаза, отщепляющая целлобиозу, и экзоглюкозидаза, осуществляющая гидролиз с образованием глюкозы, которая, в свою очередь, доступна в качестве питательного субстрата для большинства почвенных микроорганизмов [7].

Ферменты, именуемые эндоглюканазами, гидролизуют гликозидные связи, удаленные от конца цепи. Наибольшее сродство у этих ферментов наблюдается к тем олигосахаридам, которые включают в свой состав от шести и более остатков глюкозы. Для отщепления концевых элементарных звеньев в живой природе присутствуют экзоглюканазы; обнаружено всего два фермента этой группы: экзо-1,4-глюкозидаза и целлобиогидролаза. Эти ферменты способны отщеплять глюкозу или целлобиозу с нередуцирующего конца полисахаридов. Гидролиз межзвеньевых связей у олигосахаридов обеспечивают глюкозидазы [2].

Глюкозидазы составляют основную группу среди ферментов гликозилгидролазы, которые катализируют селективное расщепление гликозидных связей. Эта функция играет ключевую роль во многих важнейших биологических путях, таких как деградация структурных и накопительных полисахаридов, клеточная сигнализация, онкогенез, взаимодействие хозяина и патогена, а также в ряде биотехнологических применений. В последние годы интерес к этим ферментам набирает обороты благодаря их биосинтетическим способностям. Ферменты проявляют полезность в синтезе разнообразных олигосахаридов, гликоконъюгатов, алкил-и аминогликозидов [10].

© 2020 г. Лушников А.В., Гнеушева И.А., Солохина И.Ю.

\* **Автор для переписки:**

Солохина Ирина Юрьевна

канд. биол. наук, доцент кафедры биотехнологии,

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

E-mail: solohinairina@yandex.ru

Интенсивность биосинтеза метаболитов грибов рода *Trichoderma* зависит от скорости потребления углеводов продуцентом из питательной среды. Для оптимального роста продуцента метаболитов наиболее значимым является углеводный компонент питательной среды — сахароза, в присутствии которой рост биомассы мицелия идет быстрее [3]. Немаловажными слагаемыми биотехнологического процесса для культивирования популяции микроорганизмов служит подбор условий ферментации: выбор источников питания, подбор количества посевного материала, подбор оптимальных условий роста (значение температуры, рН среды, аэрация и т.д.), нахождение оптимальной питательной среды [4]. Следует отметить, что с практических позиций на процесс ферментации оказывает влияние наличие данных о кинетике действия фермента, которые позволяют подобрать оптимальные условия для его работы, оказывать влияние на активность фермента в заданном направлении на различных стадиях технологического процесса.

Исходя из вышесказанного, целью настоящего исследования являлось установление кинетических характеристик протекания реакции расщепления сахарозы в экстракте биомассы *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в лабораторной обстановке путем оптимизации условий биосинтетической деятельности глубинного культивирования.

### Материалы и методы

Бульонные культуры *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 в состоянии поздней экспоненциальной фазы роста отбирали и центрифугировали 10 минут с ускорением 5000 g, при температуре 4 °С. Супернатант декантировали, осадок ресуспендировали в охлажденном до 4 °С 50 мМ калий-фосфатном буферном растворе, рН 7,0, встряхивали на вортексе и центрифугировали 10 минут с ускорением 5000 g, при температуре 4 °С (повторяли три раза). Отмытый от среды осадок ресуспендировали тем же буфером и подвергали ультразвуковой дезинтеграции на приборе «Soniprep 150» (MSE, Великобритания) в охлаждаемой кювете. Программа дезинтеграции состояла из 10 циклов с чередованием по 10 секунд импульса и 10 секунд паузы, частота 23 кГц, амплитуда XXX мкм. Полученный гомогенат центрифугировали 10 минут, с ускорением 10000 g, при температуре +4 °С, супернатант отбирали и отделяли от остатков дебриса фильтрацией через мембрану «Владипор» типа МФА-МА (ТУ 6-05-1903-87). Фильтрат центрифугировали

90 минут, с ускорением 10000 g, при температуре -4 °С, наслаивали этилацетат, инкубировали 30 минут на льду и аспирировали верхний неполярный слой. Остаток сутки диализировали против деионизированной воды (ГОСТ Р 52501-2005) при температуре +4 °С, диаметр пор 3,5 кДа.

Удельную активность фермента рассчитывали по формуле:

$$U_{\text{уд.}} = \frac{\Delta S}{t \times C_{\text{белка}}}$$

В субстратно-буферный раствор [Myrback, 1960; Sumner, 1935], состоящий из 1,9 частей 50 мМ ацетатного буфера, рН 4,6 и 2 частей 0,3 М сахарозы, предварительно прогретый до комнатной температуры (25±2 °С), вносили раствор фермента в соотношении 1:39, инкубировали при заданных значениях температуры и времени и останавливали реакцию прибавлением 1 М раствора карбоната натрия (6:4). Концентрацию сахарозы рассчитывали по количеству образовавшейся глюкозы, которое измеряли глюкозооксидазным методом, с помощью набора «ГЛЮКОЗА ДДС» (АО «Диакон-ДС», Пушкино); количество белка в пробе определяли по Bradford (1976) [9], полученные результаты умножали на коэффициент разведения.

### Результаты и обсуждение

Для установления оптимальных условий для протекания реакции расщепления сахарозы и контроля этого процесса определяли кинетические характеристики ферментсодержащего экстракта биомассы *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434. На рисунке 1 приведены значения удельной активности сахарозы в экстракте биомассы, под влиянием варьируемых параметров.

Согласно диаграммам, среднее значение удельной активности сахарозы в пределах оптимального интервала рН составило 242,67±3,0 мкмоль/мин×мг;  $C_v=1,27\%$ . Смещение рН на 0,5 снижает удельную активность на 4,96—15,23%. Наибольший показатель активности определен при температуре 38 °С и составил 255,55±5,4 мкмоль/мин×мг, минимальная активность 3,41±0,5 мкмоль/мин×мг установлена при 63 °С, выявлен оптимальный температурный интервал 23—33 °С со средним значением удельной активности 245,99±2,4 мкмоль/мин×мг;  $C_v=0,99\%$ . Увеличение температуры свыше 38 °С снижает активность на 9,75—98,66%, в дальнейшем инкубация при  $T < 43$  °С нецелесообразна. Относительно времени реакции удельная активность изменяется пропорционально



показателю времени (в заданном интервале) и с 5 по 10 минут увеличивается от  $187,32 \pm 3,6$  до  $406,34 \pm 5,8$  мкмоль/мин×мг.

Таким образом, из вышеизложенного можно заключить, что оптимальные условия для ферментативной реакции создаются в течение  $t=7$  минут, при  $T=28^\circ\text{C}$  в

среде с  $\text{pH}=5,2$ ; усредненное значение  $U_{\text{уд}} = 243,22 \pm 0,7$  мкмоль/мин×мг.

Также из результатов эксперимента очевидно, что концентрация субстрата убывает в зависимости от времени по кривой, линеаризировав которую, получали график функции  $\ln S=f(t)$  (рис. 2)

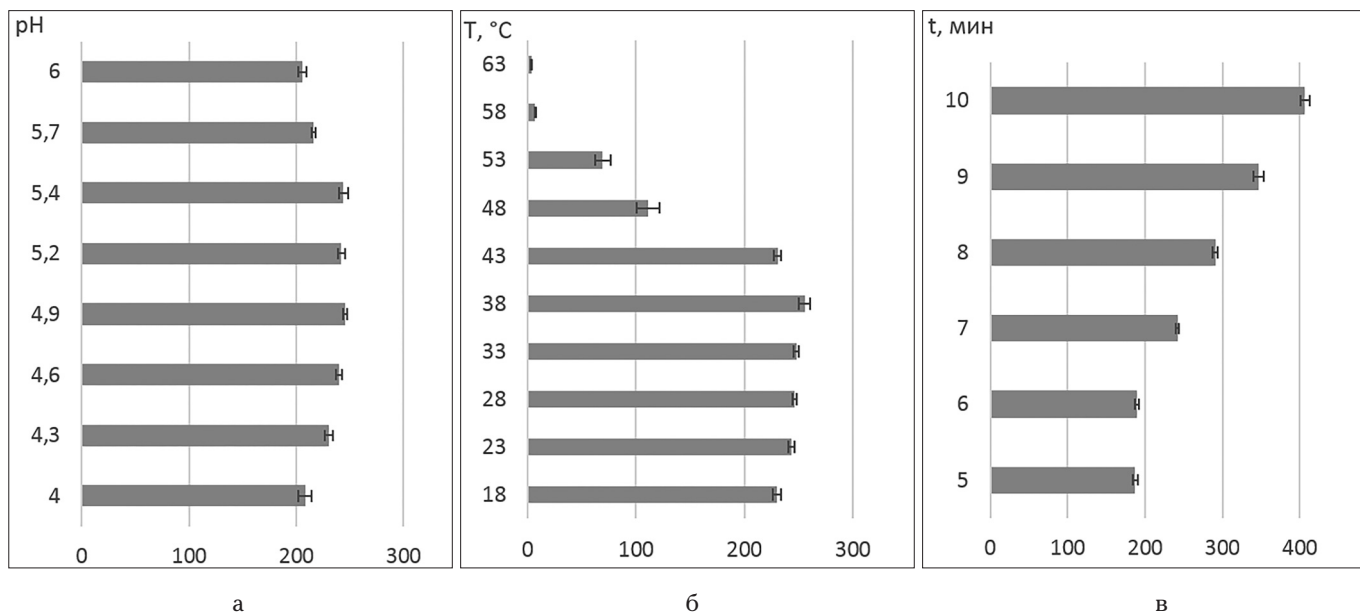


Рис. 1. Удельная активность сахаразы *T. atrobrunneum* ( $\bar{U}_{\text{уд}} \pm \sigma$ , мкмоль/мин×мг) под влиянием изменения: а – pH среды; б – температуры; в – времени инкубации

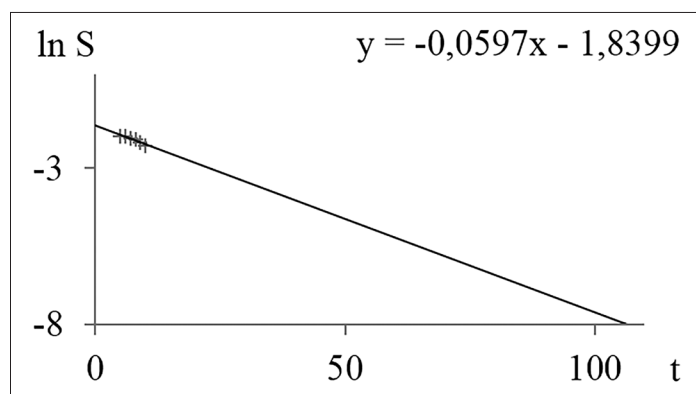


Рис. 2. Зависимость логарифма концентрации от времени для реакции расщепления сахарозы

Графическим методом определяется первый порядок реакции, следовательно, уравнение скорости реакции будет иметь вид  $v=k_1(S_0-S)=dS/dt$ . Проинтегрировав, получали  $\ln S_0 = \ln(S_0-S) - k_1 t$ , откуда находили значение константы скорости:

$$k_1 = \frac{1}{t} \times \ln \frac{S_0}{S_0 - S} \quad (1).$$

Расчитав константы скорости при каждой температуре инкубации (рис. 3а), получали экспоненциальную зависимость между данными величинами, которая описывается уравнением Аррениуса:

$$k = A \times e^{-E_a/RT}$$

Проинтегрировав, получали линейную функцию

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \times \frac{1}{T} \quad (2) \quad (\text{рис. 3б}).$$

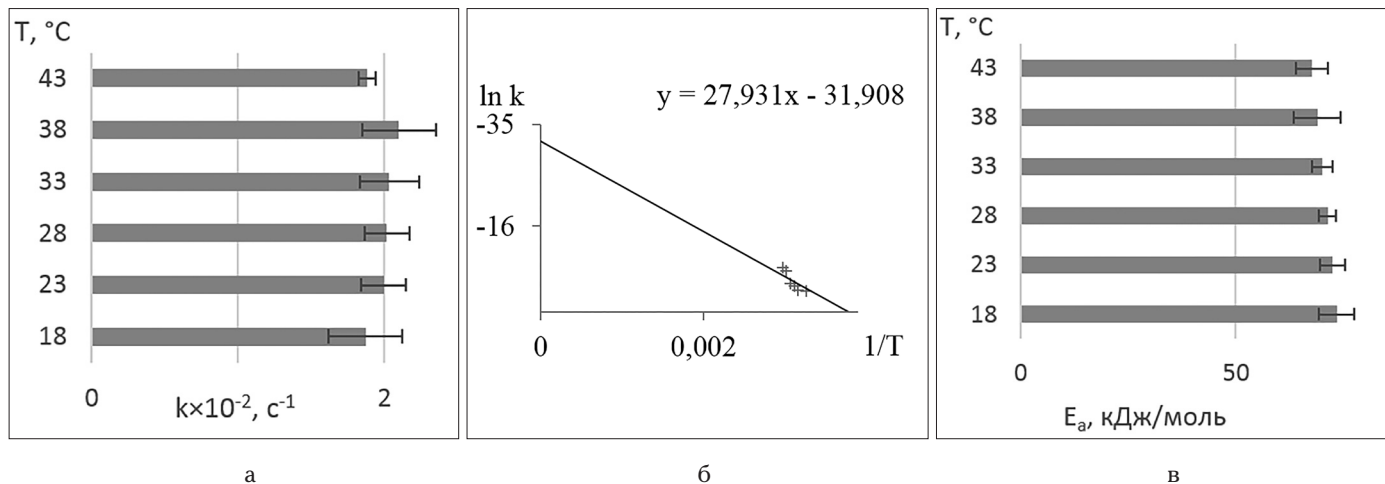


Рис. 3. Влияние температуры на константу скорости и энергию активации

По данным графика, находим предэкспоненциальный множитель, натуральный логарифм которого численно равен значению коэффициента смещения; следовательно,  $A - e^{-31,908} = 1,388 \times 10^{-14} \text{ с}^{-1}$  — постоянная величина. Из равенства (2) находили энергию активации:

$$E_a - RT \times \ln \frac{k}{A}$$

На диаграмме 3в представлены значения энергии активации в указанном температурном диапазоне, где видно, что в пределах оптимума  $E_a$  изменяется незначительно, Это также подтверждает правильность выбора режима инкубации реакционной смеси. Так, повышение температуры ожидаемо приводит к уменьшению энергии активации, следовательно, и к увеличению значения константы скорости.

Для определения влияния концентрации субстрата на скорость реакции ставили серию опытов с варьированием концентрации сахарозы. В оптимизированных условиях измеряли удельную активность в разведениях от 0,05 до 0275 с шагом в 0,025 моль/л и пересчитывали в скорость (моль/мин×л), при  $T=28 \text{ }^\circ\text{C}$   $k=2,01 \times 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ . В результате установили зависимость скорости реакции от концентрации субстрата, имеющую параболический график (рис. 4а), который, следовательно, описывается уравнением Михаэлиса – Ментен. Графоаналитически определяется, что насыщающая концентрация сахарозы  $S=0,25 \text{ моль/л}$  ( $V=4,004 \pm 0,02 \times 10^{-4} \text{ моль/мин} \times \text{л}$ ;  $U_{уд} = 468,945 \pm 3,1 \text{ мкмоль/мин} \times \text{мг}$ ). Используя метод двойных обратных величин Лайнувера – Берка, получена линейная функция  $1/V=f(1/S): \frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_m} \times \frac{1}{S_0} + \frac{1}{V_m}$  (рис. 4б).

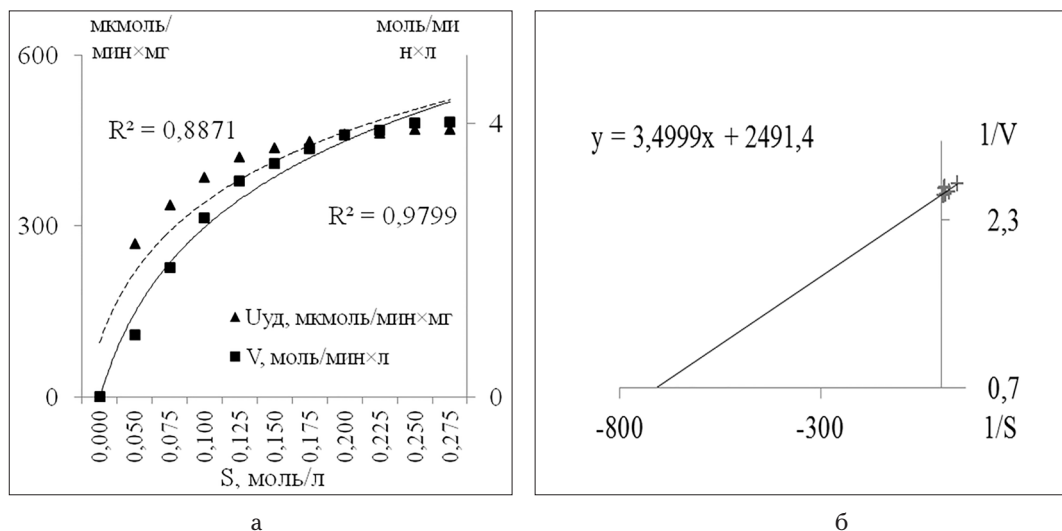


Рис. 4. а) График зависимости удельной активности и скорости ферментативной реакции ( $\times 10^{-4}$ ) от концентрации сахарозы. б) Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата

По рисунку 46 с помощью линейной аппроксимации получали уравнение функции  $1/V=f(1/S)$ , в котором  $K_M=3,4999/2491,4=1,404\times 10^{-3}$  моль/л; при этом  $V_m=1/2491,4=4,013\times 10^{-4}$  моль/мин $\times$ л — постоянные величины.

### Заключение

На основании проведенных исследований кинетических характеристик ферментсодержащего экстракта биомассы *T. atrobrunneum* ВКПМ F-1434 были установлены оптимальные условия для расщепления сахарозы:  $t=7$  минут, при  $T=28^\circ\text{C}$  в питательной среде с  $\text{pH}=5,2$ . Усредненное значение удельной активности составляет  $243,22\pm 0,7$  мкмоль/мин $\times$ мг. Данные параметры ферментации расщепления сахарозы подтверждены зависимостью убывания концентрации субстрата от времени, энергией активации ( $E_a$ ), которая изменяется незначительно в температурном оптимуме при  $28^\circ\text{C}$ . Используя уравнение Михаэлиса — Ментен, которое выражает зависимость скорости реакции от концентрации субстрата, установили насыщающую концентрацию сахарозы ( $S$ ), которая составила  $0,25$  моль/л.

### Литература

1. Алимова Ф.К. Современная система *Trichoderma/Hyphospora* // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. — 2005. — С. 28–55.
2. Генералов Е.А. Физико-химические подходы к анализу природных полисахаридов // Auditorium: электронный научный журнал Курского государственного университета. 2015.— № 4 (08). — С. 38–54.
3. Гнеушева И.А., Лушников А.В., Павловская Н.Е. и др. Математическое обоснование оптимального роста *Trichoderma atrobrunneum* на питательной среде с различными углеводными компонентами // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2018. — Т. 14(3). — С. 13–18.
4. Гнеушева И.А., Павловская Н.Е., Лушников А.В., Маркина О.А. Определение оптимальной среды и условий глубинного культивирования продуцента бактериостатических метаболитов *Trichoderma atrobrunneum* ВКПМ F-1434 // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2019. — Т. 15(1). — С. 10–16.
5. Гнеушева И.А., Павловская Н.Е., Яковлева И.В. Биологическая активность грибов рода *Trichoderma* и их промышленное применение // Вестник ОрелГАУ. — 2010. — № 3. — С. 36–38.
6. Зиганшин Д.Д., Сироткин А.С. Особенности глубинного и поверхностного культивирования грибов *Trichoderma* для получения биопрепаратов на основе клеток гриба // Вестник технологического университета. — 2017. — Т. 20. — № 10. — С. 155–158.
7. Лабутова Н.М., Банкина Т.А. Основы биогеохимии: учеб. пособие. — СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2013. — 240 с.
8. Bhatia Y., Mishra S., Bisaria V. Microbial  $\beta$ -glucosidases: Cloning, properties, and applications // Critical Reviews in Biotechnology. — 2002. — Vol. 22. — No. 4. — P. 375–407.
9. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248–254.
10. Oskiera M., Szczech M., Bartoszewski G. Molecular identification of *Trichoderma* strains collected to develop plant growth-promoting and biocontrol agents // Journal of Horticultural Research. — 2015. — Vol. 23(1). — P. 75–86.

## KINETIC CHARACTERISTICS OF SUCROSE CLEAVAGE IN *TRICHODERMA ATROBRUNNEUM* BIOMASS EXTRACT VKPM F-1434

A.V. LUSHNIKOV, I.A. GNEUSHEVA, I.Yu. SOLOHINA

*N.V. Parahin Orel State Agrarian University, Orel*

Kinetic characteristics of sucrose of *Trichoderma atrobrunneum* biomass extract VKPM F-1434 were determined. The optimal temperature range of  $23\text{--}33^\circ\text{C}$  was found with an average specific activity value of  $245.99\pm 2.4$  mmol/min $\times$ mg;  $\text{CV}=0.99\%$ . It is shown that an increase in temperature above  $38^\circ\text{C}$  reduces activity, and further temperature increase is beside the purpose. Optimal conditions for the enzymatic reaction during  $t=7$  minutes, at  $T=28^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=5.2$ ; average specific activity  $243.22\pm 0.7$  mmol/min $\times$ mg. The selected parameters of the fermentation kinetics are confirmed by the following indicators: calculations of the reaction rate at experimental incubation temperatures from  $18\text{--}43^\circ\text{C}$  showed that the activation energy of  $E_a$  changes slightly in the temperature optimum, which is  $28^\circ\text{C}$ . The effect of the substrate concentration on the reaction rate was calculated using the Michaelis — Menten equation, which was used to establish the saturating concentration of sucrose  $S=0.25$  mol/l.

**Keywords:** *Trichoderma atrobrunneum*, sucrose, specific activity, kinetics of the enzymatic reaction.

# АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ИММУНОАНАЛИЗА ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

И.В. ЖАРНИКОВА\*, С.А. КУРЧЕВА, Д.В. РУСАНОВА, Т.В. ЖАРНИКОВА

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь

Исследована аналитическая характеристика диагностических препаратов для иммуноанализа особо опасных инфекций; туляремии, бруцеллеза, сибирской язвы (споровой и вегетативной форм), холеры. Чувствительность препаратов при выявлении возбудителей инфекций от  $1 \times 10^3$  м.к./мл до  $5,0 \times 10^6$  м.к./мл, при выявлении антител — от 1:800 до 1:40000. Проведено сравнительное изучение препаратов по чувствительности (активности), длительности реакции, времени и виду учета результатов, сроку годности, форме выпуска, количеству проводимых анализов. Представлены основные требования, которые необходимо соблюдать при постановке иммуноанализов для достижения качественных результатов и даны рекомендации по использованию методов анализа в зависимости от объекта исследования и поставленной цели.

**Ключевые слова:** иммуноанализ, иммуноферментный анализ, реакция иммунофлуоресценции, реакция непрямой гемагглютинации, реакция агглютинации.

## Введение

Область применения иммуноанализов разнообразна, но чаще их используют с диагностическими целями практически во всех отраслях медицины, ветеринарии и биологии. Термин «иммуноанализ» в международной литературе применяют не к любым методам исследований, используемым в иммунологии, а только к тем, в которых ключевыми взаимодействующими субстанциями являются исходно растворимые «антиген» и «антитело» (лиганды). В более чем 99% современных тест-систем иммуноанализов один из компонентов (антиген или антитело) сорбирован на твердой фазе, но сорбированы они из растворимого состояния [10]. Такие методы обладают высокой чувствительностью, специфичностью, требуют минимального количества биоматериала, позволяют получать количественные, объективные результаты, а также осуществлять скрининг или диагностику на ранних стадиях заболевания при минимальных изменениях в организме или объекте исследования [7].

К основным методам иммуноанализа относятся: иммуноферментный анализ (ИФА), реакция иммунофлуоресценции (РИФ), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), реакция агглютинации (РА).

ИФА является одним из наиболее активно развивающихся направлений химической энзимологии как в нашей стране, так и за рубежом. Это обусловлено тем, что в ИФА уникальная специфичность иммунохимического анализа сочетается с высокой чувствительностью детекции ферментативной метки [8]. Преимуществом этого метода является и то, что можно осуществлять качественное и количественное определение возбудителей инфекционных болезней в различном патологическом материале и антитела различных классов в сыворотке крови, плазме и др. [3, 4].

Не менее важным методом диагностики представляется РИФ — люминесцентный экспресс-анализ выявления как возбудителей инфекционных болезней, так и антител к ним [1, 5].

Доступный чувствительный метод иммуноанализа — РНГА и РА с визуальным учетом результатов, не требующий дорогостоящего оборудования [2, 6].

## Материалы и методы

Для определения чувствительности и специфичности диагностических препаратов, направленных на выявление возбудителей инфекций, использовали следующие штаммы микроорганизмов: *Brucella (B.) abortus* 19ВА, *B. suis* 61, *B. melitensis* Rev-1, *Francisella (F.) tularensis*

© 2020 г. Жарникова И.В., Курчева С.А., Русанова Д.В., Жарникова Т.В.

\* Автор для переписки:

Жарникова Ирина Викторовна

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора

E-mail: ivj-biotech@yandex.ru

319/38, *F. tularensis* 122, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *F. tularensis* 144/713, *Vibrio (V.) cholerae* O139 SG-24, *V. cholerae* O139 VO-15, *V. cholerae* El Tor C-600, *V. cholerae* El Tor C-310, *V. cholerae* El Tor C-336, *Shigella (Sh.) flexneri* 1a 8516, *Yersinia (Y.) enterocolitica* 383, *Salmonella (S.) typhimurium* 9640, *Escherichia (E.) coli* 113-3, *E. coli* Тк7 (0111), *Bacillus (B.) anthracis* 71/12, *B. anthracis* СТИ-1, *B. anthracis* 228/8, *B. subtilis* 37, *B. subtilis* 83; *B. megaterium* 2, *B. megaterium* 89, *B. cereus* 16, *B. cereus* 8035, полученные из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

Для определения чувствительности и специфичности диагностических препаратов, направленных на выявление антител к возбудителям инфекций, применялись следующие сыворотки: бруцеллезная поливалентная, холерная O1 адсорбированная сухая для РА, поливалентная сальмонеллезная адсорбированная сухая O — для РА (А, В, С, Д, Е), бруцеллезная адсорбированная агглютинирующая сухая, туляремиальная адсорбированная агглютинирующая, эшерихиозная O3 поливалентная — для РА.

Учет результатов РИФ проводили на люминесцентном микроскопе «PrimoStariLED». Чувствительность и специфичность ИФА определяли по методике М. Clark и А. Adams [9] в «сэндвич»-варианте ИФА на фотометре Multiscan FC ЗАО «Термо Фишер Сайентифик». При работе с магнимоносорбентами (МИС) использовали магнитный концентратор DynaMagSpin, «InvitrogenDynaAS», Норвегия.

Статистическую обработку полученных результатов проводили, оценивая дисперсию, стандартное отклонение, доверительный интервал выборки из результатов эксперимента с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel 2007.

## Результаты

В ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора в настоящее время разработаны и выпускаются 12 зарегистрированных диагностических препаратов для иммуноанализа особо опасных инфекций (ООИ): эритроцитарные (2), иммуноферментные (3), иммунофлуоресцентные (4), магнимоносорбентные (2) и диагностикум для реакции агглютинации (1). По виду диагностируемых инфекционных заболеваний препараты подразделяются на: сибиреязвенные — 2 препарата; туляремиальные — 5; бруцеллезные — 4; холерные — 1. По учету результатов реакций: визуальный — 3 препарата и инструментальный — 9.

Область применения препаратов — клиническая лабораторная диагностика, диагностика инфекционных заболеваний для выявления инфекционного агента и процесса болезни; эпидемиологический и эпизоотологический надзор для выявления источника инфекции, путей ее передачи, эффективности вакцинации и т.д.

Практически все выпускаемые диагностические препараты получены с использованием так называемых «свидетелей». Такими «свидетелями» являются: а) носители антигена или антитела (эритроциты, сорбенты). Эти методы используются в РНГА, реакциях торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА), МИС с ИФА; б) различные метки одного из участников взаимодействия антиген-антитело (ферментные, флуоресцирующие). В зависимости от использованной метки эти тесты подразделяются на ИФА, РИФ, реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ).

Выпускаемые диагностические препараты используются в двух направлениях:

- Обнаружение с диагностической целью антител в сыворотке крови обследуемого. Постановка реакции проводится с заведомо известным антигеном. Достоверные результаты получают при исследовании парных сывороток крови больного, взятой в начале заболевания (3–7-е сутки) и через 10–12 дней. В этом случае удается наблюдать динамику нарастания антител.
- Установление родовой и видовой принадлежности микроорганизма. В этом случае неизвестным компонентом реакции является антиген. Такое исследование требует постановки реакции с заведомо известными иммунными сыворотками, содержащими антитела.

Реакции, не требующие инструментального учета:

**1. РА.** Для этого разработан и зарегистрирован диагностикум бруцеллезный жидкий для реакции агглютинации, суспензия для диагностических целей. Эта реакция обусловлена склеиванием целых микробных клеток (агглютиногенов) гомологичными антителами (агглютинидами) в присутствии электролитов, что проявляется образованием хорошо видимых хлопьев агглютината, выпадающего в растворе в осадок.

Диагностикум бруцеллезный жидкий для РА предназначен для серологической диагностики бруцеллеза у людей с помощью РА объемным (пробирочным) методом — реакция Райта и пластинчатым (на стекле) методом — реакция Хеддльсона.

Специфическая активность: диагностикум в разведении 1:10 дает агглютинацию 50% (2 креста) с

сывороткой бруцеллезной поливалентной в разведении 1:1000. В реакции агглютинации на стекле цельный диагностикум дает не менее 50% (2 креста) с сывороткой бруцеллезной поливалентной в разведении 1:50. Ампула диагностикума рассчитана на проведение анализа 4 проб (в реакции Райта) или 13 проб (при проведении реакции Хеддльсона).

**2. РНГА.** Эта реакция обусловлена образованием гемагглютининов в присутствии гомологичных антигенов (АГ) или антител (АТ), хорошо видимая невооруженным глазом. Основным компонентом РНГА является эритроцитарный диагностикум, полученный путем сенсибилизации активированных вторичным алкилсульфатом натрия формализированных эритроцитов лигандами (антителами или антигенами).

Выпускаемые препараты для РНГА:

- РНГА, направленная на выявление антител. Для этого разработан и зарегистрирован «Набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный жидкий («РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ»)). Набор предназначен для выявления антител в сыворотках крови животных и людей больных, переболевших и вакцинированных против туляремии в реакции непрямой гемагглютинации, а также для идентификации возбудителя туляремии в бактериальных культурах, обнаружения туляремийного антигена в биологическом материале и объектах окружающей среды в реакции нейтрализации антител (РНГАт). Специфическая активность: в РНГА выявляют специфические антитела в сыворотке диагностической туляремийной агглютинирующей в разведении 1:40000 — макрометодом и 1:20000 — микрометодом; в РНГАт — культуры *F. tularensis* в концентрации  $2,0 \times 10^6$  м.к./мл макрометодом и  $4,0 \times 10^6$  м.к./мл микрометодом. Специфичность: набор не дает положительных результатов в РНГА с диагностическими гетерологичными сыворотками в разведении до  $\frac{1}{4}$  их титра.

- РНГА, направленная на выявление антигена. Для этого разработан «Набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый жидкий («РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ»)). Набор реагентов предназначен для идентификации возбудителя туляремии в бактериальных культурах, обнаружения туляремийного антигена в биологическом материале и объектах окружающей среды в реакции непрямой гемагглютинации, а также для выявления антител в сыворотках крови животных и людей больных, переболевших и вакцинированных против туляремии в реакции нейтрализации антигена (РНГАг). Специфическая активность: набор выявляет туляремийный микроб в концентрации  $3,12 \times 10^6$

м.к./мл в РНГА макрометодом;  $6,25 \times 10^6$  м.к./мл в РНГА микрометодом. В РНГАг набор выявляет антитела в сыворотке туляремийной агглютинирующей в разведении 1:16000 — макрометодом, 1:8000 — микрометодом. Специфичность: набор не выявляет гетерологичные микроорганизмы в концентрации  $1,0 \times 10^8$  м.к. в РНГА.

В состав набора входит основной компонент — диагностикум эритроцитарный туляремийный (антигенный/иммуноглобулиновый) и все необходимые ингредиенты для постановки РНГА, РНГАт, РНГАг, РТНГА. В набор входят 3 флакона с диагностикумом по 5 мл 5% взвеси.

К реакциям, требующим инструментального учета, с применением конъюгированных ферментом или красителем иммуноглобулинов или антигенов относятся:

**3. РИФ.** При постановке РИФ антиген (Аг), содержащийся в исследуемом материале, специфически взаимодействует с иммуноглобулинами (Иг), конъюгированными с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ). Образовавшийся комплекс «антиген-антитело» наблюдают в люминесцентном микроскопе по морфологии бактериальной клетки и интенсивности свечения. Основным компонентом РИФ являются иммуноглобулины флуоресцирующие, полученные путем конъюгации иммуноглобулинов (сибирязвенных; туляремийных; бруцеллезных) с ФИТЦ с хроматографической очисткой от несвязавшегося красителя. Выпускаемые препараты для РИФ:

- РИФ, направленная на выявление возбудителя сибирской язвы. Для этого разработаны «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибирязвенные споровые адсорбированные сухие». Препарат предназначен для обнаружения спор *B. anthracis* в реакции иммунофлуоресценции в мазках из чистых культур, объектах окружающей среды (почва, подстилка, вода, продовольственное сырье, фураж) и биологического материала (продукты животного происхождения). Препарат в рабочем разведении обеспечивает специфическое зеленовато-желтое свечение интенсивностью на 3–4 креста споровой формы *B. anthracis* и не вызывает специфическую флуоресценцию гетерологичных микроорганизмов в споровой форме в концентрации  $1,0 \times 10^8$  м.к. в мл.

Для обнаружения вегетативной формы сибирской язвы разработаны «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибирязвенные вегетативные адсорбированные сухие». Препарат предназначен для обнаружения вегетативной формы *B. anthracis* в реакции иммунофлуоресценции в мазках из чистых культур, объектах окружающей среды (почва, подстилка, вода,

продовольственное сырье, фураж) и биологического материала (продукты животного происхождения). Препарат в рабочем разведении обеспечивает специфическое зеленовато-желтое свечение интенсивностью на 3–4 креста вегетативной формы *B. anthracis* и не вызывает специфическую флуоресценцию гетерологичных микроорганизмов в вегетативной форме в концентрации  $1,0 \times 10^8$  м.к. в мл.

Аналогичные препараты выпускаются для выявления возбудителей туляремии («Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные сухие») и бруцеллеза («Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие бруцеллезные сухие») в реакции иммунофлуоресценции в мазках из чистых культур, объектах окружающей среды и биологического материала. Препарат в рабочем разведении обеспечивает специфическое зеленовато-желтое свечение интенсивностью на 3–4 креста *F. tularensis* и *Brusella* spp. и не вызывает специфическую флуоресценцию гетерологичных микроорганизмов в концентрации  $1,0 \times 10^8$  м.к. в мл.

**4. ИФА.** В основе метода лежит иммунологическая реакция специфического взаимодействия антигена и антитела, в которой в качестве индикатора используются молекулы фермента (пероксидазы хрена). Основным компонентом ИФА является иммунопероксидазный конъюгат, полученный в результате конъюгации активированного фермента пероксидазы хрена с иммуноглобулинами и хроматографической очистки от несвязавшихся компонентов. Выпускаемые препараты для ИФА:

- Набор реагентов тест-система диагностическая для выявления возбудителя бруцеллеза в иммуноферментном анализе (ИФА) («ИФА-Бру-СтавНИПЧИ»). Набор реагентов предназначен для выявления возбудителя бруцеллеза при исследовании биологического материала и объектов окружающей среды в ИФА. Чувствительность: набор выявляет возбудителя бруцеллеза в концентрации  $5,0 \times 10^6$  м.к./мл при рабочем разведении конъюгата. Специфичность: набор не выявляет гетерологичные микроорганизмы в концентрации  $1,0 \times 10^8$  м.к./мл при рабочем разведении конъюгата.

- Набор реагентов тест-система иммуноферментная для выявления антител к возбудителю бруцеллеза («ИФА-Бру-Аг-СтавНИПЧИ»). Набор предназначен для обнаружения антител к возбудителю бруцеллеза при исследовании в ИФА сывороток крови больных людей, а также подозрительных на заболевание при остром бруцеллезе. Чувствительность: набор выявляет в ИФА антитела в сыворотке диагностической бруцеллезной в разведении 1:800 при рабочем разведении конъюгата.

Специфичность: набор не дает положительных результатов в ИФА с гетерологичными сыворотками в разведении 1:400 и выше при рабочем разведении конъюгата.

- Набор реагентов тест-система диагностическая для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе (ИФА) («ИФА-Тул-СтавНИПЧИ»). Набор реагентов предназначен для выявления возбудителя туляремии при исследовании биологического материала и объектов окружающей среды в ИФА. Чувствительность: набор выявляет туляремийный микроб в концентрации  $1,0 \times 10^6$  м.к./мл при рабочем разведении конъюгата. Специфичность: набор не выявляет гетерологичные микроорганизмы в концентрации  $1,0 \times 10^8$  м.к./мл при рабочем разведении конъюгата.

В состав набора входит основной компонент — иммунопероксидазный конъюгат и все необходимые ингредиенты для постановки ИФА.

**5. ИФА с МИС.** Это селективное концентрирование возбудителей инфекций на МИС с последующей постановкой иммунологической реакции специфического взаимодействия антигена и антитела, в которой в качестве индикатора используются молекулы фермента (пероксидазы хрена). Основным компонентом ИФА с МИС является магноиммуносорбент, представляющий собой магнитную органокремнеземную матрицу, модифицированную полиглобулином, активированную перхлоратом натрия и конъюгируемую с иммуноглобулинами. Выпускаемые препараты для ИФА с МИС:

- Набор реагентов тест-система иммуноферментная магноиммуносорбентная для выявления холерного вибриона («ИФА-МИС-Холера-СтавНИПЧИ»). Набор предназначен для селективного концентрирования холерного вибриона из водных объектов окружающей среды (вода поверхностных водоемов, сточные воды, вода из кранов, арыков и т.д.) на магноиммуносорбенте с последующей постановкой ИФА. Реакцию ИФА+МИС используют как качественный экспресс-метод для получения предварительного результата. Чувствительность: набор выявляет холерные вибрионы в концентрации  $1,0 \times 10^3$  м.к. при рабочем разведении конъюгата. Специфичность: набор не выявляет гетерологичные микроорганизмы в концентрации  $1,0 \times 10^5$  м.к. при рабочем разведении конъюгата (для энтеротоксигенных штаммов рода *Escherichia*. Специфичность составляет не менее 90%).

- Набор реагентов тест-система иммуноферментная магноиммуносорбентная для выявления возбудителя туляремии («ИФА-МИС-Тул-СтавНИПЧИ»). Набор предназначен для селективного концентрирования возбудителя туляремии из объектов окружающей

среды на магноиммуносорбенте с последующей постановкой ИФА. Реакцию ИФА+МИС используют как качественный экспресс-метод для получения предварительного результата. Чувствительность: набор выявляет туляремийный микроб в концентрации  $1,0 \times 10^3$  м.к. при рабочем разведении конъюгата. Специфичность: набор не выявляет гетерологичные

микроорганизмы в концентрации  $1,0 \times 10^5$  м.к. при рабочем разведении конъюгата.

В состав набора входят основные компоненты — иммунопероксидазный конъюгат, магноиммуносорбент и все необходимые ингредиенты для постановки ИФА.

Аналитические характеристики выпускаемых диагностических препаратов представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Аналитические характеристики диагностических препаратов для иммуноанализа опасных инфекций**

Наименование препарата	Чувствительность (активность) м.к./мл (разведение)	Длительность реакции	Время учета результатов, мин.	Вид учета результатов	Срок годности, год	Единица измерения	Форма отпуска	Количество проводимых анализов
1	2	3	4	5	7	8	9	10
Диагностикум бруцеллезный жидкий для реакции агглютинации	на стекле — не менее 50% (2 креста) с сывороткой бр. в развед. 1:50	реакция Райта 16 ч; реакция Хеддльсона — 1 ч.	20	Визуальный	2	1 мл	упаковка 10 амп. (20 мл)	40 проб (в реакции Райта) или 130 проб (при проведении реакции Хеддльсона)
РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ	$2,0 \times 10^6$ — макро и $4,0 \times 10^6$ — микро	Макро — 24 ч; микро — 2,5 ч.	15	Визуальный	1	набор	набор	600 определений (при проведении РНГА макрометодом) или 6000 определений (при проведении РНГА микрометодом)
РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ	$3,12 \times 10^6$ — макро и $6,25 \times 10^6$ — микро	Макро — 24 ч; микро — 2,5 ч.	15	Визуальный	1	набор	набор	600 определений (при проведении РНГА макро-) или 6000 определений (при проведении РНГА микрометодом).
Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные споровые адсорбированные сухие	$1,0 \times 10^6$	РИФ — 1ч 20 мин; РНИФ — 2 ч.	20	Инструментальный — люм. микроскоп	3	1 амп. (0,5 мл)	упаковка 5 амп.	не менее 80 анализов (зависит от титра препарата)
Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные вегетативные адсорбированные сухие	$1,0 \times 10^6$	РИФ — 1ч 20 мин; РНИФ — 2 ч.	20	Инструментальный — люм. микроскоп	3	1 амп. (0,5 мл)	упаковка 5 амп.	не менее 80 анализов
Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные сухие	$5,0 \times 10^6$	РИФ — 1ч 20 мин; РНИФ — 2 ч.	20	Инструментальный — люм. микроскоп	3	1 амп. (0,5 мл)	упаковка 5 амп.	не менее 80 анализов
Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие бруцеллезные сухие	$5,0 \times 10^6$	РИФ — 1ч 20 мин; РНИФ — 2 ч.	20	Инструментальный — люм. микроскоп	3	1 амп. (0,5 мл)	упаковка 5 амп.	не менее 80 анализов



ИФА-Бру-СтавНИПЧИ	$5,0 \times 10^6$	19 ч (из них сенсibilизация – 16 ч)	20	Инструментальный – фотометр	1	набор	набор	При проведении анализов в дубликатах: 94 пробы и 2 контрольных образца
ИФА-Бру-Аг-СтавНИПЧИ	1:800	19 ч (из них сенсibilизация – 16 ч)	20	Инструментальный – фотометр	1	набор	набор	При проведении в дубликатах: 94 пробы и 2 контрольных образца
ИФА-Тул-СтавНИПЧИ	$1,0 \times 10^6$	19 ч (из них сенсibilизация – 16 ч)	20	Инструментальный – фотометр	1	набор	набор	При проведении анализов в дубликатах: 94 пробы и 2 контрольных образца
ИФА-МИС-Холера-СтавНИПЧИ	$1,0 \times 10^3$	1,5 ч	20	Инструментальный – фотометр	1	набор	набор	При проведении анализов в дубликатах: 36 неизвестных образцов и 2 контрольных образца
ИФА-МИС-Тул-СтавНИПЧИ	$1,0 \times 10^3$	1,5 ч	20	Инструментальный – фотометр	1	набор	набор	При проведении анализов в дубликатах: 36 неизвестных образцов и 2 контрольных образца

### Заключение

В современных условиях вопросы диагностики решаются комплексно. Диагностическая цепочка должна регулярно сочетать традиционные и новейшие технологии с целью получения быстрого и точного результата анализа. В зависимости от поставленной задачи по диагностике инфекционных болезней необходимо исходить из нескольких факторов: количество инфицированных (при наличии большого количества можно использовать ИФА); исследуемый объект изучения (при выявлении возбудителя инфекции из объектов окружающей среды – большие объемы жидкостей и сильно загрязненные) можно применить селективное концентрирование патогенов на МИС с последующей постановкой экспресс-метода ИФА; оснащение лабораторий (в зависимости от этого используют визуальный (РА, РНГА) или инструментальный учет результатов реакции (ИФА, РИФ); концентрация возбудителя инфекции (при концентрации ниже, чем  $1 \times 10^4$  м.к./мл целесообразно использовать методы с чувствительностью выше пороговой – ИФА с МИС); срочность диагностики (например, реакция Хеддльсона – 1 ч; микрометод РНГА – 2,5 ч; РИФ –

1 ч 20 мин; РНИФ – 2 ч; ИФА с МИС – 1,5 ч; ИФА, при предварительной сенсibilизации планшет – 3 ч).

При постановке иммуноанализов необходимо соблюдать основные требования:

1. Постановку реакции осуществлять только в соответствии с инструкцией по применению.

2. Соблюдать температурный режим хранения диагностических препаратов и постановки реакции.

3. Если в наборах для иммуноанализов не предусмотрены некоторые растворы для постановки реакции, необходимо их приготовить с точным рН и молярностью, согласно инструкции.

4. Используемая химическая посуда должна быть максимально чистой (для ИФА – обработанная хромовой смесью).

5. При инструментальном учете реакции следует проводить правильную настройку прибора (для люминесцентного микроскопа – установить соответствующие светофильтры, протереть окуляры, объективы и т.д.; при работе на фотометре – правильно установить длину волны и необходимые параметры).

Разработанные и выпускаемые диагностические препараты в ФКУЗ Ставропольский противочумный

институт Роспотребнадзора, направленные на выявление как возбудителей опасных инфекций, так и антител к ним, находят успешное применение во всех округах Российской Федерации (специализированных лабораториях учреждений, осуществляющих санитарно-эпидемиологический надзор за опасными инфекциями, лечебно-профилактических и противочумных учреждениях).

При правильном проведении тактики исследования, пробоподготовки, надлежащем использовании диагностических препаратов наблюдается положительная динамика выявления патогенов и их антител.

## Литература

1. Гаврилова Ю.К., Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Савицкая Л.В., Галкина М.В., Кочкин А.В. Экспресс-анализ активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в клеточных культурах методом иммунофлуоресценции // Биотехнология. — 2018. — Т. 34. — С. 83–88.
2. Жарникова И.В., Жданова Е.В., Жарникова Т.В., Старцева О.Л., Курчева С.А., Геогджаян А.С., Семирчева А.А., Кошкидько А.Г., Гаркуша Ю.Ю. Сравнительная характеристика биотехнологии получения эритроцитарных и латексных диагностикумов для выявления возбудителя туляремии // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2019. — Т. 15. — № 4. — С. 27–31.
3. Иммуноферментный анализ (ИФА) в клинической лабораторной диагностике. Общие принципы: учеб.-метод. пособие / К.В. Шалепо, Е.В. Спаськова, О.В. Будилова и др. — Санкт-Петербург: СПбГПМУ, 2018. — 22 с.
4. Иммуноферментный анализ в клинико-диагностических лабораториях / В.В. Долгов и др. — М.: Триада, 2007. — 320 с.
5. Кретенчук О.Ф., Алексеева Л.П., Маркина О.В., Козлова Г.А., Яговкин М.Э., Кругликов В.Д., Архангельская И.В. Оптимизация условий получения диагностических флуоресцирующих моноклональных иммуноглобулинов для идентификации холерных вибрионов 01 и 0139-серогрупп // Клиническая лабораторная диагностика. — 2012. — № 12. — С. 32–34.
6. Мельник Н.В., Крюкова Е.Н., Литенкова И.Ю., Фёдорова О.Ю., Самуйленко А.Я., Гринь С.А., Ключинцева Н.С., Мельник Р.Н. Эритроцитарные диагностикумы и применение в ветеринарии // Ветеринария Кубани. — 2017. — № 3. — С. 15–17.
7. Методы иммуноанализа, основанные на применении меченых компонентов: учеб.-метод. пособие / Д.А. Черношей, Т.А. Канашкова. — Минск: БГМУ, 2007. — 28 с.
8. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров и др. — М.: Высш. школа, 1991. — 288 с.
9. Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus // J. Gen. Virol. — 1977. — Vol. 36. — No. 3. — P. 475–483.
10. [http://vmede.org/sait/?id=Immunologija\\_pra\\_koval4k\\_2010&menu=Immunologija\\_pra\\_koval4k\\_2010&page=5](http://vmede.org/sait/?id=Immunologija_pra_koval4k_2010&menu=Immunologija_pra_koval4k_2010&page=5).

## ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF DIAGNOSTIC PREPARATION FOR IMMUNOASSAY OF PARTICULARLY DANGEROUS INFECTIONS

I.V. ZHARNIKOVA, S.A. KURCHEVA, D.V. RUSANOVA, T.V. ZHARNIKOVA

*Stavropol Antiplague Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol*

The article presents analytical characteristics of diagnostic preparation for immunoassay of particularly dangerous infections: tularemia, brucellosis, anthrax (spore and vegetative forms), cholera. The sensitivity of preparation in the detection of infectious agents from  $1 \times 10^3$  m.c./ml to  $5,0 \times 10^6$  m.c./ml, in the detection of antibodies — from 1:800 to 1:40000. A comparative study of drugs by sensitivity (activity), reaction duration, time and type of accounting for results, shelf life, form of release, and the number of tests performed. The main requirements that must be met when setting up immunoassays to achieve high-quality results are presented, and recommendations are given on the use of analysis methods depending on the object of research and the goal set.

**Keywords:** immunoassay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the reaction immunofluorescence (RIF), reaction of indirect hemagglutination (RIH), the reaction of agglutination (RA).

# РОЛЬ АДМИНИСТРАТИВНО-ПРАВОВОГО РЕГУЛИРОВАНИЯ В РАЗВИТИИ ГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ НА ПРИМЕРЕ РОССИИ И ЗАРУБЕЖНЫХ СТРАН

Ю.А. ПЕТУШКОВА\*, П.А. КАМЕНСКИЙ

*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

Обзорная статья с включением собственных данных посвящена определению роли административной отрасли права в развитии геномных технологий. Приведены примеры опыта зарубежных стран, предлагающих различные модели государственного управления в сфере генетических технологий, каждая из которых привела к их развитию и активному внедрению. Определены ключевые параметры административно-правового регулирования, обеспечивающие развитие геномных технологий. Проведена оценка системы государственного управления в сфере геномных технологий в России. Разработана модель административно-правового регулирования для сферы геномных технологий в Российской Федерации, отвечающая критериям эффективности, выраженной в балансе между развитием технологической сферы, с одной стороны, и обеспечения биобезопасности, с другой.

*Ключевые слова:* геномные технологии, генная инженерия, ГМО, административно-правовое регулирование, геномное редактирование, контроль и надзор в сфере геномных технологий.

## Введение

Правовое регулирование геномных технологий обеспечивается несколькими публичными отраслями права: во-первых, экологическим правом, традиционно включающим в предмет отрасли общественные отношения в сфере генно-инженерной деятельности, исходя из биологической природы объекта регулирования; во-вторых, международным правом в рамках биотехнологии, рассматриваемой Конвенцией о биоразнообразии (Рио-де-Жанейро), и последующих протоколов к ней [18]; в-третьих, современной отраслью информационного права в части геномной информации. Вместе с тем специалисты отмечают, что в данный момент в российском праве отсутствуют критерии оценки границ ответственности, прав и обязанностей, иными словами, всего того, что составляет содержание правоотношений [2].

При этом основной публичной отраслью права, призванной обеспечить баланс между развитием фундаментальной биотехнологии, внедрением эффективных разработок в сфере геномных технологий в различные сектора экономики, с одной стороны, и гарантией всех видов безопасности, с другой стороны, остается административное право. Ад-

министративная отрасль права рассматривает принципы и механизм государственного управления в сфере геномных технологий, а также реализацию функций контроля и надзора во всех направлениях применения геномных технологий.

В отличие от других отраслей публичного права, затрагивающих сферу геномных технологий, административно-правовой подход к ее регулированию в разных странах реализуется кардинально по-разному, тогда как отличия в принципах и нормах других публичных отраслей права, связанных с генно-инженерной деятельностью, незначительны в юридическом аспекте и непринципиальны с точки зрения развития геномных технологий и внедрения соответствующих разработок.

Целью настоящего исследования было оценить роль административно-правового регулирования в прикладном аспекте развития биологических наук, в первую очередь, биотехнологии, микробиологии, генетики, молекулярной биологии, биоинженерии и других направлений в сфере геномных технологий. В связи с этим поставлены следующие задачи:

- провести функциональный анализ механизма государственного управления в сфере геномных технологий в России;
- провести сравнительно-правовой анализ административно-правового регулирования геномных технологий в зарубежных странах;
- выявить особенности административно-правовых моделей, ускоряющих или сдерживающих научно-технологическое развитие в сфере геномных технологий;

© 2020 г. Петушкова Ю.А., Каменский П.А.

\* **Автор для переписки:**

Петушкова Юлия Алексеевна,

к.б.н., с.н.с. кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

E-mail: jupponline@gmail.com)

- оценить реализацию контрольно-надзорных функций государственных органов власти в России и за рубежом в сфере геномных технологий;
- провести моделирование административно-правового регулирования в России, направленного на повышение эффективности внедрения генетических технологий на основе положительного опыта зарубежных стран в условиях действующего российского законодательства.

### Механизм государственного управления в сфере геномных технологий в России

В России административно-правовое регулирование основывается на системе и структуре федеральных органов исполнительной власти. Учитывая, что область геномных технологий входит в сферу полномочий одновременно нескольких органов исполнительной власти, основной проблемой является пересечение их ответственности.

В соответствии с обновленной структурой федеральных органов исполнительной власти, утвержденной Указом Президента РФ 27.01.2020 г. [13], в качестве субъектов административно-правового регулирования можно выделить 4 министерства, 3 федеральных

службы и 2 федеральных агентства. Ввиду того, что некоторые федеральные службы и агентства являются органами, подведомственными министерствам, количество самостоятельно и независимо друг от друга принимающих решение федеральных органов исполнительной власти сокращается до восьми, однако и при этом в значительной степени остается проблема пересечения полномочий. Остальные органы исполнительной власти в меньшей степени вовлечены в сферу генетических технологий. Руководство деятельностью всех органов, имеющих полномочия в сфере геномных технологий, осуществляет Правительство Российской Федерации; тем не менее, при отсутствии специализированного комитета/комиссии в сфере генетических технологий при Правительстве РФ координация деятельности подведомственных ему ведомств как *de jure*, так и *de facto* отсутствует.

В таблице 1 представлены результаты функционального анализа административно-правового механизма в сфере геномных технологий в России, выделены министерства и ведомства, которые отвечают за использование права в сфере геномных технологий, их применения и оборота соответствующих продуктов.

Таблица 1

### Административно-правовой механизм в сфере геномных технологий в России

Министерство (ведомство)	Управленческая и нормотворческая функция	Контрольно-надзорная функция	Целевой ориентир, в том числе соответствие со Стратегией научно-технологического развития РФ [12]	Потенциальные проблемы пересечения полномочий
Минздрав России [8]	Внедрение современных медицинских технологий, новых методов профилактики, диагностики, лечения и реабилитации	Обеспечение качества, эффективности и безопасности лекарственных средств	Присоединение к международным договорам в сфере использования генетических ресурсов [11], развитие персонализированной медицины	Минздрав ограничен в развитии и применении технологий геномной инженерии в случае необходимости выращивания генно-инженерно-модифицированных животных и растений, в том числе лекарственных растений
Минобрнауки России [7]	Развитие федеральных центров науки и высоких технологий, нормативно-правовое регулирование научной деятельности	Не вправе осуществлять функцию контроля и надзора в установленной сфере деятельности (компетенция ФС по надзору в сфере образования и науки)	Развитие природоподобных технологий, создание системы управления в области науки, технологий и инноваций	Научные разработки в сфере геномной инженерии деятельности не применимы на практике, переходя в сферу полномочия других министерств, препятствующих внедрению на рынок
Минприроды России [5] (ФС по надзору в сфере природопользования, ФА водных ресурсов)	Использование и воспроизводство природных ресурсов (включает генофонд)	Государственная экологическая экспертиза, государственный экологический надзор, обращение с отходами	Реализация целевых задач Конвенции о биоразнообразии	Полномочия по экологической экспертизе в отношении продуктов геномной инженерии, включая технологии геномного редактирования, затрагивают также земли сельскохозяйственного назначения

Минсельхоз России [6] (ФС по ветеринарному и фитосанитарному надзору)	Управление селекционными достижениями, семеноводством	Обращение лекарственных средств ветеринарного применения, растениеводство, животноводство	Разработка генетических технологий геномного редактирования, создание линий растений и животных, устойчивых к неблагоприятным условиям окружающей среды и болезням, обладающих повышенной продуктивностью, улучшенными пищевыми и технологическими свойствами	Необходимость согласовывать внедрение технологий геномного редактирования с Минприроды России, потенциальная возможность введения взаимоисключающих требований по их использованию
Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) [10]	Мониторинг воздействия на человека и окружающую среду генно-инженерно-модифицированных организмов и продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы, и контроль за выпуском таких организмов в окружающую среду — в пределах своей компетенции	Контроль качества и безопасности пищевых продуктов	Гарантия выхода на рынок безопасной продукции	Контроль безопасности также распространяется не только на продукцию, но и на технологии получения, что выходит за рамки компетенций Роспотребнадзора и влечет введение избыточных требований для поступления на рынок продукции с применением методов геномных технологий (экономическая нецелесообразность)

Как видно из таблицы 1, функции органов исполнительной власти сосредоточены не на генетических технологиях и их продуктах, а на целевом использовании соответствующих технологий и продуктов. В этой связи одни и те же технологии и одни и те же продукты относятся к различным подходам административно-правового регулирования. Эффективность административного права зависит от степени универсальности подходов к регулированию одной и той же группы общественных отношений, что справедливо для случаев развития стратегически важных технологических задач. Стратегия научно-технологического развития РФ предусматривает общую стратегическую цель — обеспечить лидерство России на глобальных технологических рынках.

Мозаичность административно-правовой модели, выраженная во множественности уполномоченных органов исполнительной власти, отсутствие единой системы контроля и надзора в сфере геномных технологий создает препятствие для достижения важных целевых показателей технологического развития. Так, например, вопрос о присоединении к значимым в рассматриваемой сфере международным договорам: к Картахенскому протоколу по биобезопасности, к Нагойско-Куала-Лумпурский дополнительный протоколу об ответственности и возмещении за ущерб к Картахенскому протоколу по биобезопасности, к Нагойскому протоколу регулирования доступа к генетическим ресурсам и совместному использованию на

справедливой и равной основе выгод от их применения, сначала относился к компетенции Минприроды России, а с 2019 года перешел в сферу ответственности Минздрава России [11]. Такие перераспределения ответственности органов государственного управления значительно увеличивают периоды принятия глобальных решений, влияющих на правовые основы развития генетических технологий и, как следствие, экономического потенциала их применения.

При скоординированной системе государственного управления можно ожидать увеличения темпов внедрения генетических технологий по всем отраслям экономики. Предусмотренный в настоящее время целевой подход административно-правового регулирования эффективно реализуется при выполнении одного из двух условий:

- наличие законодательной базы, утверждающей общие принципы, цели и задачи правового регулирования в сфере геномных технологий, разграничение полномочий государственных органов управления;
- создание органа государственной власти, уполномоченного в сфере геномных технологий, который будет отвечать за выработку и реализацию государственной политики в соответствующей сфере, устанавливать общие принципы контроля и надзора в сфере генетических технологий.

Следовательно, для координации деятельности органов государственного управления может быть ре-

ализован либо законодательный подход, либо административно-правовой.

### **Модели административно-правового регулирования геномных технологий в зарубежных странах**

В качестве примера рассмотрены модели государственного управления в зарубежных странах, являющихся лидерами в сфере применения геномных технологий.

Совокупный среднегодовой темп роста составляет 17,2% за период 2018–2025 гг. на рынке геномного редактирования в Северной Америке. Наряду с этим ожидается всплеск развития прецизионной и регенеративной медицины [19]. Таким образом, современное развитие геномных технологий как открывает широкие возможности, так и ставит перед государствами новые вызовы, требующие совершенствования административно-правовых механизмов при осуществлении контрольно-надзорных функций.

**Аргентина** [15]. Административно-правовая модель предусматривает участие уполномоченного органа — Аргентинского национального Совета по сельскохозяйственной биотехнологии (CONABIA), подведомственного Министерству сельского хозяйства. Орган исследует воздействие агробiotехнологий на экосистемы, формируется с представительством членов от государственных служащих, ученых и специалистов в сфере сельского хозяйства. Орган является междисциплинарным и межведомственным координационным центром с рекомендательными полномочиями, не наделенный контрольно-надзорными функциями. При этом его решения идут в основу юридически обязывающих актов Министерства сельского хозяйства.

В соответствии с законодательством регистрация, контроль и надзор в сфере геномных технологий основаны на риск-ориентированном подходе, разработанном с учетом научных и технических критериев. Так, продукты геномных технологий в Аргентине оцениваются на основании их характеристик и отличий от традиционных аналогов, то есть принцип существенной эквивалентности распространяется не только на продукты потребления, но и на культуры, предполагаемые для выпуска в окружающую среду. Управление всей деятельностью в сфере геномных технологий централизовано в рамках компетенции Министерства сельского хозяйства. Административно-правовая функция министерства заключается в координации деятельности советов по биобезопасности, в том числе CONABIA, формировании политики и раз-

работке нормативного правового регулирования в сфере агробiotехнологии.

Наличие в системе органов исполнительной власти агентства в сфере геномных технологий обеспечивает ускорение процессов коммерциализации биотехнологической продукции, но требует дополнительных затрат бюджета на содержание такого органа. В Аргентине это компенсируется активным внедрением биотехнологий.

**Китай** [16]. В Китае основным органом исполнительной власти, ответственным за развитие биотехнологии, является Министерство сельского хозяйства (MARA). В его полномочия входит регистрация все новых трансформационных событий о выращиваемых на территории генетически модифицированных растений и животных для всех видов использования, регулирование микробной биотехнологической промышленности, разработка нормативной правовой документации по оценке продуктов геномного редактирования, однако в настоящее время соответствующие продукты рассматриваются в Китае как ГМО. Министерство сельского хозяйства несет полную ответственность за принятие решений по импорту или выращиванию отечественных ГМ-культур, их биобезопасности, а также безопасности пищи и кормов.

Итак, Министерство сельского хозяйства Китая объединило административно-правовые полномочия в сфере геномных технологий нескольких ведомств. За Министерством здравоохранения Китая остается контроль оборота лекарственных средств и применения геномных технологий в отношении человека. Модель административно-правового регулирования геномных технологий в Китае значительно упрощает регистрацию и внедрение новых разработок и способствует развитию геномных технологий.

**Япония** [17]. Административно-правовая модель наиболее напоминает российскую. В сфере геномных технологий имеют полномочия Министерство здравоохранения, Министерство сельского хозяйства, лесного хозяйства и рыбоводства, Министерство окружающей среды, Министерство образования, культуры, спорта, науки и технологий, а также Комиссия по пищевой безопасности. При этом существенным отличием является законодательная проработка административно-правового регулирования, вследствие чего в Японии удалось избежать межведомственного конфликта правовых подходов. Второй особенностью является законодательно установленный продукт-ориентированный подход. Безопасность геномных технологий основана на безопасности продуктов и регулируется законом о биологическом разнообразии, содержащим нормы по использованию ГМО.

### **Административно-правовые предпосылки развития и причины сдерживания внедрения геномных технологий**

Наряду со спецификой определения субъектов административного права, осуществляющих властные полномочия в сфере геномных технологий, административное право предполагает определить предмет правового регулирования. В настоящее время геномные технологии могут быть отнесены к сфере генно-инженерной деятельности, в соответствии с чем на отношения в сфере геномных технологий будут распространяться положения ФЗ-86 «О государственном регулировании в сфере генно-инженерной деятельности» [14]. При этом понятийный аппарат в законе устарел и не содержит тех объектов правоотношений, которые предусмотрены в Стратегии научно-технологического развития РФ.

Так, например, технологии генетического редактирования, определяемые как точечные направленные изменения в геноме без внесения чужеродного генетического материала, не закреплены в положениях ФЗ-86. При этом остается неясным, относятся ли продукты, полученные таким способом, к генно-инженерно-модифицированным организмам или нет ввиду четкого определения в законодательстве [4].

При этом формирование понятийного аппарата в законодательстве может осуществляться не только в связи с развитием биологической науки и появлением новых методов и объектов, но и с учетом наработанных концептуальных подходов юридической науки. Примеры несогласованных подходов были отмечены в статье, посвященной вопросам развития понятийного аппарата в экологическом праве. Автор ссылается на отсутствие единых критериев дефиниций правовых понятий, обозначающих дифференцированные природные объекты. При этом отмечается проблема необоснованной, по мнению автора, замены понятия «природные объекты» в экологическом законодательстве на понятие «компоненты природной среды» с заменой ключевого в экологическом праве понятия «природные объекты». Так, на законодательном уровне противоречий не выявлено, тогда как новые дефиниции появились в праве без учета сложившихся теоретических представлений в науке экологического права [3]. Понятие «генетические ресурсы» также автоматически выпало из традиционной концепции экологического права, так как они относятся к тем самым компонентам природной среды, которые изменили внутреннюю сущность экологического права.

Таким образом, актуализация понятийного аппарата, относящегося к предмету административно-правового

регулирования в сфере геномных технологий, может быть проведена, исходя из следующих условий:

- соответствие понятийного аппарата современной биологической науке;
- соответствие действующему законодательству по всем отраслям права;
- соответствие традиционным теоретическим представлениям юридической науки для унификации последующего совершенствования законодательства во избежание вариативности трактовки юридического смысла тех положений, к которым применим метод юридического толкования.

В пользу третьего условия можно привести аргумент, заключающийся в судебной практике, когда в случаях неоднозначности правовых норм предлагается рассматривать их традиционный юридический смысл, исходя из анализа аналогичных правоотношений в рассматриваемой отрасли права и первичных целей установления правоотношения. В первую очередь, такой подход практикует Конституционный Суд РФ, а также другие высшие органы судебной власти.

Соблюдение всех трех условий является комплексной задачей совершенствования законодательства, причем реализация каждого из них представляет отдельную задачу, требующую использования научного аппарата как биологической, так и юридической науки.

Административное право в сфере геномных технологий в формировании дефиниций зависит от развития отрасли экологического права, которая определяет понятие «генетические ресурсы» каждого компонента природной среды. Очевидно, что технологии сами по себе не представляют отдельного интереса административно-правового регулирования, так как не реализуются без использования объектов — генетических ресурсов. Наряду с этим технологический аспект их применения неизбежно влечет актуализацию административно-правового законодательства, сущность которого заключается в реализации контрольно-надзорных функций органов исполнительной власти. Определение предмета контроля и надзора, отношений в сфере геномных технологий сводится к определению объекта правоотношений, технологий и их продуктов. В результате формируется система административно-правового регулирования, основывающаяся на контроле технологий, либо на контроле продуктов, либо на смешанной системе контроля продуктов и технологий геномного редактирования, которая реализуется в России. Эффективность любой из систем основывается на дефинициях, определяющих каждую систему. Для подходов, рассматривающих в качестве

объекта регулирования технологии, в соответствии с вызовами современной биологической науки требуются юридические определения различных генетических технологий: технологии геномного редактирования и его разновидности, технологии генетических модификаций с привнесением чужеродного генома. Продукт-ориентированный подход требует введения своих понятий, таких как трансген, цисген, интраген, генетически редактируемый организм и т.д. Любая система дефиниций, которая войдет в законодательно установленный понятийный аппарат, однажды принятая, найдет отражение в формировании отрасли административного права как юридической науки, которая также впоследствии имеет неизменную структуру, в отличие от пересматриваемых нормативных правовых актов.

Определение объектов правового регулирования может идти как путем детализации понятий и их предельной правовой дифференциации, либо, наоборот, путем обобщения понятий. Оба этих подхода в административно-правовом регулировании имеют свои плюсы и минусы. Первый подход предполагает гибкую систему регистрации и контроля определенных технологий/продуктов на основе упрощенной оценки их безопасности, исходя из особенности их природы. Второй подход уравнивает все технологии/продукты, но при этом упрощает систему контроля, являющуюся универсальной. Первый подход активно реализуется в Аргентине, второй — в Канаде [16].

Оба примера связаны с примерами эффективного внедрения генетических технологий на рынок, а также успешной модели административно-правового регулирования, обеспечивающей контроль безопасности.

На основании вышесказанного можно сделать выводы о причинах сдерживания развития геномных технологий в механизме административно-правового регулирования, совершенствование которого приведет к соответствующему развитию:

1. Отставание или несогласованность терминов и понятий современной биологической науки и законодательства, влекущее к пробелам административно-правового регулирования.
2. Несогласованность дефиниций и подходов к формированию понятийного аппарата биологической и юридической науки, ведущая к утрате юридического смысла правового регулирования.
3. Межотраслевой конфликт правового регулирования, приводящий к взаимоисключающим принципам и подходам различных отраслей

права, что зачастую связано с недостаточной степенью присутствия административной отрасли права.

### **Разработка модели административно-правового регулирования гено-инженерной деятельности в России с целью повышения эффективности государственного управления в сфере геномных технологий**

Одной из главных составляющих административно-правового регулирования является, по мнению специалистов, эффективность полномочий государственной исполнительной власти, сопряженная с социальным эффектом от их реализации. Под эффективностью понимается совокупность правотворческих и правоприменительных полномочий, которая при условии их нормативного закрепления позволяет путем содействия в реализации прав и обязанностей невластных субъектов согласовывать публичные и частные интересы [1].

Разработка модели основывалась на последовательном анализе цепочки «Ситуация — проблема — пути решения — предложения к реализации в России».

**Ситуация.** В настоящее время национальное административно-правовое регулирование в сфере геномных технологий, включая контроль их применения, основано на целевом использовании технологий [9], что приводит к пересечению полномочий многочисленных федеральных органов исполнительной власти, в сферу компетенций которых входит правовое регулирование и контроль геномных технологий, применяемых в соответствующих подведомственных отраслях.

**Проблема.** Такое пересечение полномочий государственного правового регулирования приводит к следующим последствиям:

- юридическим: издание нормативных актов одного уровня в иерархии нормативных правовых актов (ведомственного), содержащих как противоречивые требования в отношении применения одних и тех же технологий, так и избыточные нормы вследствие дублирования требований при их регистрации в нескольких органах, исходя из целевого применения;
- управленческим: пересечение полномочий органов исполнительной власти в сфере государственного контроля одних и тех же технологий и, как следствие, «размывание» ответственности, а также дублирование некоторых полномочий и соответствующего бюджетного финансирования;



- экономическим: увеличение затрат производителя биотехнологической продукции вследствие необходимости ее регистрации в нескольких органах по разным установленным правилам и, как следствие, увеличение стоимости такой продукции;
- общенаучные: разработка новых геномных технологий становится все менее рентабельной, так как рынок сужается до применения только в одной из сфер применения.

**Пути решения.** Для решения проблемы разграничения полномочий административно-правового регулирования в зарубежных странах были реализованы следующие модели.

- делегирование полномочий в сфере биотехнологии одному органу исполнительной власти. Пример: Аргентина, Китай. Однако в сложившейся ситуации в России такая реализация будет означать утрату используемых в течение длительного периода полномочий несколькими федеральными органами исполнительной власти и их передачу одному ведомству, что на практике едва ли применимо;
- создание единого органа по контролю при Правительстве (надведомственный уровень), либо создание самостоятельного федерального органа исполнительной власти, уполномоченного в сфере геномных технологий (биотехнологий). Пример: Евросоюз, США. Однако Евросоюз формирует бюджет из поступлений всех стран-членов, что значительно уменьшает расходы на административно-правовое регулирование биотехнологии каждой страны ЕС, а в США экономический результат от внедрения биотехнологической продукции и регистрационная активность компаний настолько высоки, что дополнительные расходы на административное регулирование в государстве экономически обосновано;
- уход от контроля технологий с переориентацией на продукт-ориентированную оценку безопасности, что позволяет уйти от необходимости создания единого исполнительного органа, регулирующего сферу биотехнологии. Пример: Канада.

**Предложение к реализации в России.** С учетом национальных особенностей правового регулирования, а также опыта зарубежных стран предлагается комбинированная модель административно-правового регулирования в сфере биотехнологии.

Постепенный переход на другую парадигму контроля в сфере биотехнологии в виде усиления в форме

генетической паспортизации продуктов, включая генетическую паспортизацию всех сельскохозяйственных растений и животных, позволит осуществлять контроль безопасности всей продукции, включая биотехнологическую. Для реализации модели предлагается подход не столь радикальный, как в Канаде, с полным прекращением правового регулирования технологий как таковых с постепенным переходом на контроль безопасности продуктов. Для этого может быть создан комитет при Правительстве России, выполняющий роль надведомственного органа, который будет уполномочен координировать действия подведомственных Правительству РФ министерств и ведомств в рассматриваемой сфере с целью устранения противоречий и иных негативных административно-правовых последствий.

При сценарии благоприятного экономического развития эффективным станет создание самостоятельного федерального органа исполнительной власти, непосредственно подведомственного Правительству РФ в статусе федеральной службы для реализации контрольно-надзорных функций.

Представленное предложение направлено на:

- усиление контроля в сфере обеспечения безопасности пищевой и сельскохозяйственной продукции путем ее генетической паспортизации;
- совершенствование административно-правовой модели в сфере биотехнологии, гармонизацию управленческих подходов в различных направлениях использования геномных технологий;
- эффективную реализацию государственных программ в сфере развития биотехнологий и сельского хозяйства, так как в настоящее время каждая программа влечет за собой создание комиссий и советов с рекомендательными функциями, каждая из которых не имеет властных полномочий, в связи с чем их решения распространяются только в сфере государственной программы, что в отсутствие единой политики и развитого законодательства в сфере биотехнологии приводит к противоречиям административно-правовых подходов к геномным технологиям внутри страны.

## Заключение

Подводя итог проведенному анализу административно-правового регулирования сферы геномных технологий в России в сопоставлении с эффективными зарубежными моделями, сделаны следующие выводы:

1. Эффективность административно-правовых моделей обеспечивается за счет одной из двух составляющих: административно-правовым законодательством и системой государственного управления с разграничением полномочий органов исполнительной власти.
2. Последующая реализация государственного управления в сфере геномных технологий основывается на двух глобальных подходах:
  - на проработанной законодательной базе при наличии системы из множества специализированных ведомств, проблема пересечения полномочий которых решается законодательно установленными базовыми принципами, целями и задачами правового регулирования, определяющими единую государственную политику (Япония);
  - на полномочиях специализированного государственного органа исполнительной власти, самостоятельного организованного или уполномоченного Правительством по выработке единой политики в сфере геномных технологий (Китай).
3. Во всех эффективных зарубежных моделях административно-правового регулирования (Канада, Аргентина, Китай, Япония) используется продукт-ориентированный подход к оценке безопасности продукции, независимо от способов ее получения. В таких случаях контролю и надзору подлежат не геномные технологии, а результаты их применения, предлагаемые к внедрению.
4. Проведена оценка системы государственного управления в сфере геномных технологий в России. Административные барьеры развития геномных технологий в РФ связаны с недоработкой законодательства, с отсутствием единой политики управления по всем направлениям применения геномных технологий, а также с презумпцией опасности таких технологий при отсутствии выработанного административно-правового механизма реализации риск-ориентированного и продукт-ориентированного подходов.
5. Разработана модель административно-правового регулирования для сферы геномных технологий в Российской Федерации, отвечающая критериям эффективности, выраженной в балансе между развитием технологической сферы, с одной стороны, и обеспечения биобезопасности, с другой.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №18-29-14024).*

## Литература

1. Ермаков А.О. Некоторые аспекты эффективности полномочий органов исполнительной власти // Административное и муниципальное право. — 2020. — № 5. — С. 1–10.
2. Жаворонкова Н.Г., Агафонов В.Б. Правовое обеспечение экологической безопасности Арктической зоны Российской Федерации при реализации геномных технологий // Lex russica (Русский закон). — 2019. — Т. 6. — С. 61–70. <https://doi.org/10.17803/1729-5920.2019.151.6.061-070>.
3. Игнатьева И.А. Проблемы создания и унификации определений правовых понятий, обозначающих природные объекты // Российский юридический журнал. — 2020. — № 2. — С. 177–187.
4. Петушикова Ю.А., Каменский П.А. Геномные технологии как предмет правового регулирования в публичных отраслях права: коллизии, проблемы и пути их решения за рубежом // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2019. — Т. 15. — № 3. — С. 52–59.
5. Постановление Правительства РФ от 11.11.2015 N 1219 (ред. от 31.08.2020) «Об утверждении Положения о Министерстве природных ресурсов и экологии Российской Федерации и об изменении и признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации» // СЗ РФ, 23.11.2015, N 47, ст. 6586 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://government.ru/docs/all/104194/>.
6. Постановление Правительства РФ от 12 июня 2008 г. N 450 «О Министерстве сельского хозяйства Российской Федерации» (ред. от 19.09.2020) // СЗ РФ от 23 июня 2008 г., N 25, ст. 2983.
7. Постановление Правительства РФ от 15 июня 2018 г. N 682 «Об утверждении Положения о Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации и признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации» // СЗ РФ от 25 июня 2018 г. N 26 ст. 3851.
8. Постановление Правительства РФ от 19 июня 2012 г. N 608 «Об утверждении Положения о Министерстве здравоохранения Российской Федерации» (ред. от 01.06.2020) // СЗ РФ от 25 июня 2012 г., N 26, ст. 3526.
9. Постановление Правительства РФ от 23 сентября 2013 г. N 839 «О государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов, предназначенных для выпуска в окружающую среду, а также продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы, включая указанную продукцию,

- ввозимую на территорию Российской Федерации» (ред. от 01.12.2018) // СЗ РФ от 30 сентября 2013 г., N 39, ст. 4991.
10. Постановление Правительства РФ от 30 июня 2004 г. N 322 «Об утверждении Положения о Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» (ред. от 30.04.2020) // СЗ РФ от 12 июля 2004 г., N 28, ст. 2899.
  11. Распоряжение Правительства РФ от 28.08.2019 N 1906-р «Об утверждении плана мероприятий по реализации Основ государственной политики Российской Федерации в области обеспечения химической и биологической безопасности на период до 2025 года и дальнейшую перспективу» // СЗ РФ, 09.09.2019, N 36, ст. 5062 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001201909040021> Дата обновления: 23.09.2020.
  12. Указ Президента РФ от 1 декабря 2016 г. № 642 «О Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации» // СЗ РФ от 5 декабря 2016 г., N 49, ст. 6887.
  13. Указ Президента РФ от 21.01.2020 N 21 (ред. от 05.06.2020) «О структуре федеральных органов исполнительной власти» // СЗ РФ, 27.01.2020, N 4, ст. 346. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202001210023>.
  14. Федеральный закон от 5 июля 1996 г. № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» (ред. от 03.07.2016) // СЗ РФ, 08.07.1996, № 28, ст. 3348.
  15. Agricultural Biotechnology Annual. Argentina. USDA. 02.15.2019 // [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/report/downloadreportbyfilename?filename=Agricultural%20Biotechnology%20Annual\\_Buenos%20Aires\\_Argentina\\_2-15-2019.pdf](https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/report/downloadreportbyfilename?filename=Agricultural%20Biotechnology%20Annual_Buenos%20Aires_Argentina_2-15-2019.pdf).
  16. Agricultural Biotechnology Annual. China. USDA. 24.02.2020 // CH2019-0202 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.fas.usda.gov/data/china-agricultural-biotechnology-annual-5>.
  17. Agricultural Biotechnology Annual. Japan. USDA. 10.17.2018 // JA8086 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.fas.usda.gov/data/japan-agricultural-biotechnology-annual>.
  18. Convention on Biological Diversity. Concluded at Rio de Janeiro on 5 June 1992 // United Nations, Treaty Series, 1993, No. 1760, 1-30619, pp. 143–382. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.cbd.int/abs/nagoya-protocol/signatories/> Дата обновления: 23.09.2020.
  19. CRISPR dominates genome editing market 6 TALENs projected to grow until 2025 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/article/default.asp?ID=18259>.

## ROLE OF ADMINISTRATIVE AND LEGAL REGULATION IN THE DEVELOPMENT OF GENOME TECHNOLOGIES ON THE EXAMPLE OF RUSSIA AND FOREIGN COUNTRIES

Yu.A. PETUSHKOVA, P.A. KAMENSKY

*Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

The review article with the inclusion of its own data is devoted to defining the role of the administrative branch of law in the development of genomic technologies. The examples of the experience of foreign countries offering various models of public administration in the field of genomic technologies, each of which led to their development and active implementation, are given. The key parameters of administrative and legal regulation that ensure the development of genomic technologies have been determined. The assessment of the public administration system in the field of genomic technologies in Russia is carried out. A model of administrative and legal regulation for the field of genomic technologies in the Russian Federation has been developed, which meets the criteria of efficiency, expressed in the balance between the development of the technological sphere, on the one hand, and ensuring biosafety, on the other.

*Keywords:* genomic technologies, genetic engineering, GMO, administrative and legal regulation, genomic editing, control and supervision in the field of genomic technologies.

# РОЛЬ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ В ИЗУЧЕНИИ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ И СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ

И.Р. СИМОНОВА\*, Е.А. БЕРЕЗНЯК, А.В. ТРИШИНА

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

В обзоре проанализированы ключевые вопросы обеспечения биобезопасности при работе с особо опасными инфекциями. Рассмотрен биоэтический аспект экспериментов на животных как модельных объектах, на которых воспроизводятся аналоги реальных клинических ситуаций. Проведена оценка валидности экспериментальных моделей. Акцентируется внимание на конкретных направлениях деятельности по обеспечению биологической безопасности. Особая значимость придана роли профессиональной подготовки при работе с ООИ.

*Ключевые слова:* особо опасные инфекции, экспериментальные биологические модели, обеспечение биобезопасности.

## Введение

Не вызывает сомнения тот факт, что экспериментальные исследования на животных сыграли значительную роль в решении научных и практических проблем медицины и биологии. Использование лабораторных животных позволяло моделировать необходимые состояния живых организмов, изучать динамику патологического процесса, метаболические сдвиги и многое другое [9, 34, 37, 40, 41, 46, 53]. Термин «животные модели» стал использоваться еще в 1930-х годах. Так, Boldessarins a. Fisher [37] трактовали модели как «экспериментальный компромисс, где простая экспериментальная система используется для понимания гораздо более сложной». В настоящее время под этим понятием принято понимать лабораторное животное, используемое в эксперименте с целью построения демонстративных или любых других адекватных моделей функционирования человека и животных для последующего описания и анализа изучаемых процессов.

Исследования на животных привели к таким значимым результатам, как: открытие инсулина (собака), вакцина против полиомиелита (обезьяна), вакцина против бешенства (мышь), пересадка кожи для ожоговых

больных (свинья), трансплантация роговицы (кролик), тестирование канцерогенов (крыса), создание анти-токсической противодифтерийной сыворотки, сульфаниламидных препаратов, а также отработка методов современной хирургии и многие другие достижения медицины. Большинство успешно применяемых вакцин было разработано с использованием моделей на животных. Учитывая множество ошибок в прогностической оценке безопасности лекарств, тестирование на лабораторных животных стало наиболее эффективным способом оценки новых фармакологических препаратов [11, 15]. В последнее время количество исследований с использованием биологических моделей заметно возрастает в связи с новыми вызовами в современном мире: увеличение числа устойчивых к лекарственным препаратам микроорганизмов; угроза биотерроризма; расширение мировой торговли и путешествий; быстро растущий список новых инфекционных заболеваний [48].

Ряд крупных научно-медицинских открытий в области изучения бактериальных особо опасных инфекций (ООИ) стал возможен исключительно благодаря наблюдениям и испытаниям на лабораторных животных. С их помощью были получены самые значимые результаты по воспроизведению инфекционного процесса, изучению иммунного ответа, разработке специфической профилактики. В настоящее время при проведении диагностических, экспериментальных и производственных работ с возбудителями I—II групп патогенности предусматривается использование только лабораторных животных: при обнаружении и выделении возбудителя в исследуемом материале, характеристике микроорганизма по патогене-

© 2020 г. Симонова И.Р., Березняк Е.А., Тришина А.В.

\* Автор для переписки:

Симонова Ирина Рафиковна  
научный сотрудник лаборатории биологической безопасности  
и лечения ООИ ФКУЗ Ростовского-на-Дону противочумного  
института Роспотребнадзора  
E-mail: labbiobez@mail.ru

тической и антифагоцитарной активности, исследовании иммунологической активности, выборе вакцинных штаммов и получении специфических сывороток. Биологическое исследование является строго обязательным при детекции возбудителей чумы и туляремии. Заражение биомоделей (биопроба), наблюдение за проявлением признаков инфекции, а также патологоанатомическими и патогистологическими изменениями дают информацию о характере инфекционного процесса и его особенностях [12, 20, 24, 25, 28]. Использование животных возможно для разработки эффективных схем этиотропной терапии, для получения биологических жидкостей, в том числе, крови и ее составляющих для различных диагностических сред и тестов. Так, на моделях экспериментальной чумы морских свинок и белых мышей была доказана эффективность профилактического и лечебного действия стрептомицина, мономицина, канамицина, антибиотиков тетрациклинового ряда и других antimicrobных препаратов [26, 32]. А на модели острой экспериментальной туляремии у белых мышей и морских свинок установлено, что антибиотики, регламентированные для экстренной профилактики и лечения туляремии, при своей высокой эффективности препятствуют формированию протективного противотуляремийного иммунитета [44]. При исследовании на холеру биологические модели используют, как правило, уже после выделения и идентификации культуры с целью определения вирулентности штамма, изучения эффективности антибактериальных препаратов. Широко используемой моделью экспериментальной холеры при определении вирулентности штамма являются кролики-сосунки и изолированные петли тонкой кишки взрослых кроликов [50].

### **Биоэтический аспект экспериментов на животных. Валидность экспериментальных моделей**

Повсеместное использование лабораторных животных в различных научных исследованиях всегда вызывало повышенный интерес общества к проблемам биоэтики.

Основными условиями использования животных в эксперименте в соответствии со стандартом GLP являются научная методология, возможность применения принципа «трех R»: Replacement — выбор и замена; Reduction — уменьшение количества животных в эксперименте; Refinement — уменьшение дистресса, боли, страданий; оценка баланса между страданиями животных и важностью целей исследования. Система GLP разработана в США, действует уже более 20 лет

и получила распространение в международном масштабе. Национальным аналогом GLP в РФ является ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», текст которого идентичен GLP.

Внедрение в жизнь принципов гуманного обращения с лабораторными животными осуществляется Комиссиями по биоэтике. Основными задачами Комиссии являются: соблюдение правовых и этических норм по содержанию позвоночных животных, используемых в научных исследованиях; применение на практике правовых норм, касающиеся исследовательских проектов и связанных с ними технологий, объектом которых являются позвоночные животные; разработка рекомендаций по модернизации процесса исследований с учетом международных и внутрироссийских требований по соблюдению норм биоэтики; экспертиза проектов, предполагающих проведение экспериментов с использованием позвоночных животных; консультирование сотрудников по вопросам биоэтики, обсуждение дизайна эксперимента и т.д. К сожалению, необходимо констатировать, что в настоящий момент деятельность комиссий по биоэтике осуществляется в условиях отсутствия единого регламента и общих представлений о базовых принципах экспертизы проектов, что вызвано отсутствием в РФ необходимой нормативной базы [29]. Неадекватное представление данных, ошибочно спланированный план эксперимента, отсутствие своевременных и полноценных публикаций могут привести к финансовым затратам, а также к временным и трудовым потерям [19].

Методика исследования, выбор животных и их количество должны быть тщательно обоснованы до начала экспериментов и одобрены Комиссией. Для снижения числа животных рекомендуется использовать биологические модели высокого качества или животных определенных линий. Сегодня все большая роль отводится генетически контролируемым (линейным) животным с определенными известными дефектами, в том числе и иммунной системы. В настоящее время существует около двухсот линий крыс, более тридцати линий морских свинок, несколько сот линий мышей, десятки инбредных линий мышей, мутантных стоксов и конгенных линий. В частности, с использованием морских свинок и мышей инбредных линий BALB/c(H2d) и C57BL/6(H2b) и аутбредных мышей Swiss Webster было проведено сравнение экспериментальных моделей туляремии для изучения вакцинных препаратов. Полученные результаты позволили считать оптимально адекватной моделью для проведения исследований по оценке реактогенности

перспективных туляреминых вакцин мышей линии BALB/c [16].

В основе исследовательской практики лежит положение о том, что успешные результаты, полученные на экспериментальных моделях, в дальнейшем могут быть перенесены на клиническую практику. Экстраполяция возможна (и производится) только на основе экспериментального материала, полученного на тех биологических моделях, на которых воспроизводятся типичные проявления биоэффекта, инициируемые исследуемым веществом [10]. Так, например, при использовании в качестве биологической модели приматов, мартышки оказались наиболее подходящей моделью для точной имитации легочной формы туляремии человека и впоследствии использовались для изучения биодоступности и эффективности антибактериального препарата левофлоксацина при лечении туляремии [8, 35]. В «Руководстве по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях» под редакцией Н.Н. Каркищенко и С.В. Грачева подробно рассматриваются подходы, пути и методы экстраполяции данных с объектов на человеческий организм с учетом основных физиологических показателей человека и лабораторных животных [22].

Критериями подобия, обуславливающими адекватность моделирования и надежность экстраполяции, являются:

- сходство у человека и экспериментальной модели биологических параметров систем, реагирующих на вещество;
- общность характеристик метаболических процессов;
- близость чувствительности, то есть значений количественных показателей, установленных для человека и модели.

Ключевым понятием, позволяющим имплементировать в клиническую практику полученные в ходе экспериментальных исследований технологии, протоколы и результаты, является их валидность — обоснованность и пригодность применения методик и результатов исследования в конкретных условиях» [30]. Валидность модели означает, что модель и моделируемый объект подобны. Под внутренней валидностью обычно понимают степень снижения систематических ошибок за счет использования правильного дизайна исследования, надлежащего выполнения исследования и адекватного анализа данных. Внешняя валидность, применительно к экспериментальным исследованиям, подразумевает возможность воспроизведения результатов исследования

в условиях одной или нескольких лабораторий, а также возможность экстраполяции данных, полученных на одном виде животных, на другие биологические виды, включая человека [22]. Если клинические исследования уже давно проводятся в соответствии с принципами доказательной медицины, экспериментальные работы требуют дополнительной унификации и стандартизации. Внедрение в экспериментальную практику основополагающих принципов доказательной медицины остается одной из приоритетных задач по повышению качества биомедицинских исследований. Многоцентровые исследования снижают различия, обусловленные условиями работы в разных лабораториях, позволяют набрать необходимое для уверенной статистической обработки количество наблюдений [1]. Анализ теоретических, методологических основ экстраполяции, ее принципов и критериев посвящено большое число публикаций [5, 7, 31, 43].

Вопросу об использовании той или иной биологической модели всегда должна предшествовать оценка доступных методов *in vitro* и *ex vivo*, необходимых для решения конкретных задач исследования [47]. В последнее время все более пристальное внимание вызывает возможность полной или частичной замены классических биологических моделей на альтернативные: эмбриональные стволовые клетки животных, клеточные линии человека и животных, различные гидробионты, искусственно выращенные органы, а также разработанные методы компьютерного или математического моделирования [39]. Учитывая всю сложность взаимодействий, возникающих при инфекционных заболеваниях, выбор экспериментальной модели должен быть четко обоснован, чтобы в конечном результате предоставить релевантные научные данные. Для ряда исследований, в том числе и в экспериментальных работах с ООИ, замена животных на культуры клеток, тканей, органов и другие модели, по-прежнему, невозможна.

### **Проблема биобезопасности. Значение профессиональной подготовки при работе с ООИ**

Проведение экспериментов на биологических моделях с использованием возбудителей I–II групп патогенности требует особого подхода и жесткого соблюдения правил биологической безопасности [23]. Возросшее в последнее время беспокойство по поводу биологических опасностей, связанных с участием в экспериментах с ООИ лабораторных животных, обосновано множеством факторов. С одной стороны, непосредственно сами жи-

вотные могут создавать аэрозоли, повреждать кожные покровы сотрудников (укусы и царапины) и так далее. С другой — источниками инфицирования могут становиться зоонозные заболевания, переносимые моделями животных загрязненные клеточные линии или другой биологический материал; экспериментальные инфекционные агенты и биологические токсины; биологические образцы; отходы, связанные с процессом ухода за лабораторными животными.

Сегодня мировое научное сообщество выработало единый взгляд на проблему обеспечения биологической безопасности при работе с патологическими биологическими агентами (ПБА), основанный на концепции управления биорисками. Общепринятым подходом является использование оценки рисков, основанных на агентах и видах деятельности, которая включает в себя следующие компоненты: идентификация опасности; выявление действий, которые могут к ней привести; вероятность того, что опасность причинит вред при воздействии; определение возможных последствий [3, 6, 18, 38, 48]. Биориски возможны при выполнении любых манипуляций с ПБА [49]. Оценка риска, несомненно, должна учитывать и факторы, непосредственно связанные с самим агентом (пути передачи, инфекционная доза, стабильность в окружающей среде, опасность вызываемого потенциального заболевания и особенности его лечения) [2, 4, 13, 45].

Процесс проведения оценки риска дает возможность его снижения путем определения альтернативных или более безопасных вариантов проведения эксперимента. Для этого разрабатывают адаптированные стандартные рабочие процедуры, в которых подробно описан план по снижению вероятности патогенного воздействия и обеспечению безопасности, а также подготавливают программу обучения персонала [54]. При работе с биомоделями важно, чтобы те дополнительные опасности, которые создают животные и связанные с ними экспериментальные действия, были обязательно учтены [33, 48]. Информация, выявленная в результате оценки риска, служит руководством для выбора соответствующих уровней биобезопасности [52], которые, в свою очередь, определяют требования к помещениям, оборудованию, а также к практическим приемам работы с биологическими моделями.

Одним из основных принципов биобезопасности является концепция первичных и вторичных барьеров. Первичные защитные барьеры обеспечивают первый уровень защиты, который обычно определяется непосредственным контактом с биологически опасным

материалом или с зараженным животным. Боксы биологической безопасности и средства индивидуальной защиты (СИЗ) широко применяются для предотвращения неблагоприятного воздействия инфекционных материалов. В настоящее время доступны различные типы СИЗ, и возможность их использования должна определяться посредством оценки рисков, которая учитывает конкретные знания о потенциальных опасностях, выполняемых действиях, технических средствах контроля на месте, опыте и профессиональных навыках. Если инженерно-технические средства обеспечивают барьер между человеком и потенциальной опасностью, то применение средств индивидуальной защиты является конечным физическим барьером для предотвращения воздействия опасных агентов и не должно использоваться вместо соответствующих технических средств контроля [36].

Вторичные барьеры, как правило, включены в проект и конструкцию объекта и могут включать в себя такие технические средства контроля, как: специализированная вентиляция, обеспечивающая направленный поток воздуха; оборудование для фильтрации воздуха; зоны контролируемого доступа; воздушные шлюзы, расположенные на входах в лабораторию. Эти компоненты защиты способствуют безопасности работников, а также защищают людей вне лаборатории от воздействия инфекционных агентов, используемых на объекте [51]. Внедрение в лабораторную практику боксов биологической безопасности с ламинарным потоком воздуха значительно снижает уровень профессионального риска и дает основание говорить о достаточно высоком уровне защищенности персонала при работе с животными (заражение, вскрытие и т.д.).

Использование современного оборудования для содержания животных является немаловажным аспектом обеспечения безопасности персонала при работе с ПБА. Сегодня фирмы-производители предоставляют достаточно широкий выбор подобного оснащения лабораторий: от микроизоляторов до более сложных моделей, включающих в себя использование высокоэффективных фильтров (HEPA) или полностью вентилируемых систем стеллажей. Многие проблемы содержания зараженных лабораторных животных были решены путем использования улучшенных индивидуально-вентилируемых клеточных систем (ИВК), которые обеспечивают необходимой уровень защиты как исследователя, так и самого животного. ИВК являются примером оборудования первичной локализации, которое может минимизировать воздействие ПБА на человека и окружающую среду, а

также предотвратить кросс-контаминацию среди лабораторных животных [55].

Актуальным направлением совершенствования биобезопасности работ с ПБА при использовании лабораторных животных является профилактика неблагоприятных событий, обусловленных «человеческим фактором». Надлежащая подготовка всего персонала, участвующего в исследованиях с участием животных, является одним из ключевых компонентов снижения риска. При анализе архивных материалов по критерию «профессиональная категория работников, действия которых повлекли аварию» установлено, что в 39,4% случаев это были лаборанты, в 24,2% — научные сотрудники, в 15,2% — врачи-бактериологи, в 12,1% — дезинфекторы, в 9,1% — слушатели курсов. При проведении ретроспективного анализа установлено, что с 1992 по 2011 гг. были зарегистрированы 33 аварии при работе с ПБА в 9 противочумных учреждениях Роспотребнадзора. Необходимо отметить, что 26,2% аварий произошли в блоке для работы с инфицированными животными. Все зарегистрированные случаи — аварии с нарушением целостности кожных покровов при работе с лабораторными животными (белые мыши, серые крысы): укусы — 57%, порезы при вскрытии, уходе — 43%. В блоке для работы с инфицированными животными зарегистрирована одна авария в результате боя выпавшего из морозильной камеры контейнера с трупами инфицированных лабораторных животных [42].

В настоящее время в Российской Федерации сформирован системный подход к профессиональной подготовке специалистов для работы с ПБА I—II группы. Требования по допуску к работе, уровню образования, медицинскому обеспечению ББ регламентированы Санитарными правилами СП 1.3.3118-13. Персонал лабораторий опасного биологического объекта должен иметь высокий уровень профессиональной специальной подготовки по знанию требований биологической безопасности, микробиологии бактериальных и вирусных инфекций, эпидемиологии инфекционных заболеваний. Обучение подкрепляется теоретическими и практически занятиями, на которых сотрудники обучаются новым приемам безопасной работы с ПБА, использованию современного лабораторного оборудования, приемам ликвидации последствий аварий. Тренинги по ликвидации аварий проводятся постоянно и регулярно, как в лаборатории, так и в более крупном подразделении [14, 27]. Все учебные мероприятия должны быть задокументированы, четко отслеживаться, чтобы было возможно определить не только факт обучения, которое получил работник, но

и тот объем профессиональных компетенций, которого сотруднику не хватает или необходимо периодически повторять [33]. В последние 20 лет в мире наблюдается четко выраженная тенденция к снижению количества случаев внутрилабораторного инфицирования благодаря положительным сдвигам в области анализа и решения проблем биобезопасности и охраны биологически опасных объектов, улучшению качества спецодежды, росту профессионального уровня специалистов, владеющих необходимыми знаниями и современными подходами к профилактике и решению проблем биобезопасности [21]. Этой тенденции способствует и постепенная унификация национальных правил отдельных стран и их гармонизация с международными рекомендациями.

Несмотря на то, что фундаментальные концепции, лежащие в основе понятия «биобезопасности», хорошо обоснованы, эта область продолжает развиваться по мере появления новых болезней и повторного появления более старых. Всестороннее обеспечение биологической безопасности остается одной из принципиальных составляющих общей системы безопасности, обеспечивающей стабильное развитие государства.

### Заключение

Таким образом, рассмотрев место биологических моделей и их альтернатив в современном научном мире, незаменимую роль экспериментальных животных при изучении особо опасных инфекций, становится необходимым принять тот факт, что в настоящее время пока не существует технологий, способных полностью заменить тесты на животных. В задачи научного сообщества входит соблюдение баланса между безопасностью жизни исследователя и гуманным отношением к животным, что сделать не просто.

### Литература

1. Александров И.В., Егорова Е.И., Васина Е.Ю., Новиков В.К., Матько П.Г., Галагудза М.М. Экспериментальные исследования на животных в эпоху трансляционной медицины. Какими им быть? // Трансляционная медицина. — 2017. — Т. 4(2). — С. 52–70.
2. Гаврилова О.Н., Касымова Р.О., Касымов О.Т. Результаты внедрения системы оценки риска биологической безопасности в Кыргызской республике // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. — 2019. — № 6. — С. 41–47.
3. Германчук В.Г., Семакова А.П., Шавина Н.Ю. Этические принципы при обращении с лабораторными жи-



- вотными в эксперименте с патогенными биологическими агентами I–II групп // Проблемы ООИ. Саратов. — 2018. — № 4. — С. 33–38.
4. ГОСТ Р 12.0.010-2009. Определение опасностей и оценка рисков [Электронный ресурс]. — URL: <http://www.vsegost.com/Catalog/49/49985.shtml>.
  5. Даренская Н.Г., Ушаков И.Б., Иванов И.В. и др. Экстраполяция экспериментальных данных на человека: принципы, подходы и обоснование методов и их использование в радиобиологии (Практическое руководство) — М.; Воронеж: Истоки, 2004. — 231 с.
  6. Доброхотский О.Н., Дятлов А.И. Основные направления гармонизации Российских и международных требований по обеспечению биологической безопасности при работе с патогенными биологическими агентами // Гигиена и санитария. — 2013. — № 5. — С. 40–44.
  7. Исламов Р.А. Методология эксперимента с использованием лабораторных животных // КазНМУ. — 2016. — № 1. — С. 489–492.
  8. Каркищенко Н.Н. Концептуальное пространство и топологические структуры биомедицины // Биомедицина. — 2005. — № 1. — С. 5–16.
  9. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. — М.: Изд-во ВПК, 2004. — 336 с.
  10. Комбарова Т.И., Павлов В.М., Кравченко Т.Б., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Борзилов А.И. и др. Сравнительная оценка реактогенности туляреминой вакцины на различных биомоделях // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. — 2013. — № 4(71). — С. 54–62.
  11. Коробейникова Е.П., Комарова Е.Ф. Лабораторные животные — биомодели и тест-системы в фундаментальных и доклинических экспериментах в соответствии со стандартами надлежащей лабораторной практики (НЛП/GLP) // Журнал фундаментальной медицины и биологии. — 2016. — № 1. — С. 30–36.
  12. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Под ред. акад. РАМН Г.Г. Онищенко, акад. РАМН, проф. В.В. Кутырева. — Изд. 2-е, перераб. и доп. — М.: ЗАО «Шико», 2013. — 560 с.
  13. Малюкова Т.А., Бойко А.В., Панин Ю.А., Безсмертный В.Е., Кутырев В.В. Вероятность реализации биорисков при проведении работ с ПБА I–II групп // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2016. — Т. 21. — № 3. — С. 136–145. DOI 10.18821/1560-9529-2016-21-3-136-145.
  14. Малюкова Т.А., Тихомирова Л.А., Попов Ю.А., Щербакова С.А. Актуальные вопросы аккредитации специалистов, осуществляющих работы с возбудителями особо опасных инфекций // Инфекционные болезни. Новости. Лечение. Обучение. — 2018. — № 1. — С. 28–34.
  15. Медуницын Н.В. Вакцинология. — М.: «Триада-Х». 2-е изд., перераб. и доп., 2004. — 448 с.
  16. Мурашев А.Н., Попов В.С., Красильщикова М.С. и др. Национальные особенности доклинических исследований и использования лабораторных животных в России: проблемы и перспективы // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения НЦЭСМП. — 2015. — № 2. — С. 35–38.
  17. Нетесов С., Завриев С. Новые международные инициативы в области биобезопасности // Мировая экономика и международные отношения. — 2013. — № 3. — С. 39–44.
  18. Онищенко Г.Г. Оценка и управление рисками для здоровья как эффективный инструмент решения задач обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации // Анализ риска здоровью. — 2013. — № 1. — С. 4–14.
  19. Основные требования к вакцинным штаммам холерного вибриона; Методические указания. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. — 67 с.
  20. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. №708н «Об утверждении правил лабораторной практики».
  21. Растунцева Е.В., Тихомирова Л.А., Сазанова Е.В. Пути снижения рисков инфицирования при обучении работе с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности) // Проблемы особо опасных инфекций. — 2017. — Вып. 3. — С. 80–84.
  22. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / Под редакцией: Н.Н. Каркищенко и С.В. Грачева. — М.: Альтернативы биомедицины, 2010. — 336 с.
  23. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. — 304 с.
  24. Специфическая индикация патогенных биологических агентов: Практическое руководство / Под ред. акад. РАМН Г.Г. Онищенко, акад. РАМН, проф. В.В. Кутырева. 2-е изд.; перераб. и доп. — Саратов: ООО «Буква», 2014. — 284 с.
  25. Специфическая индикация патогенных биологических агентов: Практическое руководство / Под ред. Г.Г. Онищенко. — М.: ЗАО «МП Гигиена». — 228 с.
  26. Тришина А.В., Цураева Р.И., Рыжко И.В., Веркина Л.М. Перспективы применения нетилмицина для этиотропной терапии чумы, обусловленной типичными и F1-вариантами возбудителя // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. — 2009. — № 2 (прил. 1). — С. 35–36.
  27. Тюрин Е.А., Чекан Л.В., Маринин Л.И., Дятлов И.А. Профессиональный риск сотрудников микробиологических лабораторий и меры по его снижению // Анализ риска здоровью. — 2014. — № 3. — С. 44–50.

28. ФЗ от 30.03.1999 N 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения». – Собрание законодательства Российской Федерации, 1999 г.
29. Цимбалистова М.В., Павлович Н.В. Влияние этиотропной терапии на индукцию специфического иммунитета при экспериментальной туляреминой инфекции у белых мышей и морских свинок // Цитокины и воспаление. – 2014. – Т. 13. – № 1. – С. 128–129.
30. Шагидулин М.Ю., Волкова Е.А., Метельский С.Т., Севастьянов В.И. Опыт организации и проведения экспериментальных исследований в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. акад. В.И. Шумакова» // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2017. – Т. XIX. – № 4. – С. 104–112.
31. Шляхто Е.В., Конради А.О., Галагудза М.М. Трансляционная медицина: вчера, сегодня, завтра // Вестник Росздравнадзора. – 2016. – № 1. – С. 47–51.
32. Ципелева И.А., Марковская Е.И. Антибактериальная терапия чумы. Исторический срез и взгляд в будущее // Антибиотики и химиотерапия. – 2016. – Т. 61. – С. 9–10.
33. Alderman T.S., Carpenter C.B., McGirr R.. Animal research biosafety // Journal of ABSA International. – 2018. – Vol. 23(3). – P. 130–142.
34. Bailey S.A., Zidell R.H., Perry R.W. Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint? // Toxicologic Pathology. – 2004. – Vol. 32. – P. 448–466.
35. Barré-Sinoussi F., Montagutelli X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives // Future Sci. – 2015. – Vol. 1(4). – FSO63. doi: 10.4155/fso.15.63.
36. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5<sup>th</sup> Edition. – U.S. Department of Health and Human Services; Public Health Service; Centers for Disease Control and Prevention; National Institutes of Health, 2009. URL: [http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL5\\_introduction.pdf](http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL5_introduction.pdf).
37. Boldessarins R.J., Fischer J.E. Model Systems in Biological Psychiatry. – Cambridge 5: MFT Press, 1975. – 251 p.
38. Calvin B. Carpenter. Safety considerations for working with animal models involving human health hazards // Animal Model Exp. Med. – 2018. – Vol. 1(2). – P. 91–99.
39. Chalmers I, Glasziou P. Avoidable waste in the production and reporting of research evidence // Lancet. – 2009. – Vol. 374(9683). – P. 86–89.
40. Claxton J., Sacher E., Matthiessen-Guyader L. Ethical, legal and social aspects of farm animal cloning in the 6<sup>th</sup> Framework Programme for Research // Cloning and Stem Cells. – 2004. – Vol. 6. – P. 178–181.
41. Dawkins M.S. Using behaviour to assess animal welfare // Animal Welfare. – 2004. – Vol. 13. – P. 3–7.
42. John A. Maher, D. Owen Young. How to isolate a rodent: biocontainment caging options // Lab. Anima. – 2007. – Vol. 36. – P. 42–48.
43. John P.A. Ioannidis. Extrapolating from Animals to Humans // Science Translational Medicine. – 2012. – Vol. 4(151). – P. 1–5. DOI: 10.1126/scitranslmed.3004631.
44. Klimpel G.R., Eaves-Pyles T., Moen S.T., Taormina J., Peterson J.W., Chopra A.K. et al. Levofloxacin rescues mice from lethal intra-nasal infections with virulent *Francisella tularensis* and induces immunity and production of protective antibody // Vaccine. – 2008. – Vol. 26. – P. 6874–6882.
45. Laboratory Biorisk Management Standard Framework for Action 2012–2016. Laboratory Biorisk Management, WHO. – HSE, 2012. – 18 p.
46. Lawrence A.B., Conington J., Simm G. Breeding and animal welfare: practical and theoretical advantages of multi-trait selection // Animal Welfare. – 2004. – Vol. 13. – P. 191–196.
47. Lesley A. Colby, Lauriane E. Quenee, and Lois A. Zitzow. Considerations for infectious disease research studies using animals // Comparative Medicine. – 2017. – Vol 67(3). – P. 222–231.
48. Li X.Y., Xue K.N., Jiang J.S., Lu X.C. The main biological hazards in animal biosafety level 2 facilities and strategies for control // Biomedical and Environmental Sciences. – 2016. – Vol. 29(4). – P. 300–304.
49. Melissa C. Dyson, Calvin B Carpenter, Lesley A. Colby. Institutional oversight of occupational health and safety for research programs involving biohazards (overview) // Comparative Medicine by the American Association for Laboratory Animal Science. – 2017. – Vol. 67. – No. 3. – P. 192–202.
50. Nelson M., Lever M.S., Dean R., Pearce P.C., Stevens D.J., Simpson A.J. Bioavailability and efficacy of levofloxacin against *Francisella tularensis* in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) // Antimicrob. Agents Chemother. – 2010. – Vol. 54. – P. 3922–3926. doi: 10.1128/AAC.00390-10.
51. Pastorino B, de Lamballerie X, Charrel R. Biosafety and biosecurity in European containment level 3 laboratories: Focus on French recent progress and essential requirements // Front Public Health. – 2017. – Vol. 31(5). – P. 1–11. doi: 10.3389/fpubh.2017.00121. eCollection 2017.
52. Pritt S., Hankenson F.C., Wagner T. & Tate M. The basics of animal biosafety and biocontainment training // Lab. Animal. – 2007. – Vol. 36. – P. 31–38.
53. Taylor K., Gordon N., Langley G., Higgins W. Estimates for worldwide laboratory animal use in 2005 // Alternatives to Laboratory Animals (ATLA). – 2008. – Vol. 36(3). – P. 327–342.
54. The International Biorisk Management Standard (CWA 15793:2008). – Canada; 2008.
55. Villano J.S., Follo J.M. Personal protective equipment in animal research // Comp Med. – 2017. – Vol. 67(3). – P. 203–214.

## **THE ROLE OF EXPERIMENTAL BIOLOGICAL MODELS IN THE STUDY OF ESPECIALLY DANGEROUS INFECTIONS AND MODERN ASPECTS OF BIOLOGICAL SAFETY**

I.R. SIMONOVA, E.A. BEREZNYAK, A.V. TRISHINA

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

The review analyzes the key issues of ensuring biosafety when working with especially dangerous infections. The bioethical aspect of experiments on animals as model objects is considered, on which analogs of real clinical situations are reproduced. The validity of the experimental models was assessed. Attention is focused on specific areas of activity to ensure biological safety. Particular importance is attached to the role of professional training when working with especially dangerous infections.

*Keywords:* especially dangerous infections, experimental biological models, ensuring biosafety.

## ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2020 ГОДА\*

## ПЕРСОНАЛИИ

К 80-летию со дня рождения В.Г. Винтера  
(1939–2005)

В ноябре 2019 года исполнилось 80 лет со дня рождения Винтера Виктора Георгиевича, профессора, заведующего кафедрой биохимии Казанского федерального университета, заслуженного работника Высшей школы Республики Татарстан.

В.Г. Винтер родился 7 ноября 1939 года в с. Духовницкое Саратовской области в интернациональной семье. Отец Винтер Георг Генрихович был этническим поволжским немцем, мать Татьяна Васильевна Винтер-Солдатова — русская. В начале Великой Отечественной войны семья была выселена в Казахстан, в Павлодарскую область. Там Виктор окончил среднюю школу.

В 1961 году В.Г. Винтер окончил Семипалатинский зооветеринарный институт и до 1963 года работал ветврачом в Алтайском крае. В 1963 году с наступлением «оттепели» он поступил в Казани в аспирантуру по специальности «микробиология». После окончания аспирантуры и защиты кандидатской диссертации в 1967 году был оставлен в проблемной лаборатории № 7 младшим научным сотрудником. С 1969 по 1975 гг. работал руководителем Научно-исследовательской части КГУ. В 1972 году проходил научную стажировку в Великобритании. С 1975 по 1987 годы являлся заведующим лабораторией № 7,

с 1987 по 1996 годы — заведующим лабораторией биохимии нуклеиновых кислот.

В указанной лаборатории аспирантом В.Г. Винтером был впервые выявлен феномен секреции нуклеиновых кислот жизнеспособными опухолевыми клетками. Эти данные, полученные в 1965–1966 годах, вызвали дискуссию среди ученых. Статья Винтера В.Г. о выходе РНК из опухолевых клеток была опубликована в журнале «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины» (Винтер В.Г. Выход рибонуклеиновой кислоты из клеток карциномы Эрлиха // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1968. — № 10. — С. 68–71). По этим материалам им была защищена кандидатская диссертация на тему: «Об участии РНК в межклеточных взаимоотношениях при опухолевом росте».

За время стажировки в Великобритании он освоил новейшие методы анализа нуклеиновых кислот и нуклеаз, получил данные по характеристике ферментов, участвующих в обмене ДНК фага Т5. По возвращении в Казань он продолжил научные исследования ядерных ДНКаз и роли РНК в регуляции активности ДНКаз при различных функциональных состояниях организма. Тогда им впервые было обнаружено наличие ДНКазной активности негистоновых белков хроматина нормальных и опухолевых клеток. Эти исследования легли в основу его докторской диссертации «ДНКазы хроматина нормальных и опухолевых клеток и роль РНК в регуляции их активности», которая была защищена в Ленинградском университете в 1979 г.

Результаты этой диссертационной работы послужили базой для нового направления в КГУ: исследования биологической роли ядерных ДНКаз и особенностей обмена нуклеиновых кислот в нормальных и опухолевых клетках.

С 1994 года и до последних дней своей жизни В.Г. Винтер был заведующим кафедрой биохимии КГУ. Научную деятельность он сочетал с педагогической работой. Им было много сделано для возрождения кафедры биохимии начиная с 1985 года в бытность его заместителем заведующего кафедрой. Особое внимание он уделял молодежи в плане как можно более ее раннего приобщения к настоящей научной работе, в том числе в рамках интеграции академических институтов с высшей школой. Следствием этого стала востребованность выпускников кафедры: 80% из них поступили в аспирантуру в ведущие научно-исследовательские учреждения

\* Материал подготовлен В.С. Воробьевым

---

Москвы, Ленинграда, Новосибирска (Кольцово), Пушкино, Казани.

В.Г. Винтер являлся членом президиума Всероссийского общества цитологов и иммунологов, Научного Совета по химии и технологии возобновляемого растительного сырья.

В заключение следует подчеркнуть, что деятельность профессора Винтера хорошо вписалась в традиционно высокий уровень Казанской химической школы на протяжении ее 200-летней истории. Именно поэтому им были выполнены первопроход-

ческие работы по следующим темам: секреция микро-рибонуклеиновых кислот, или микроРНК (miRNA); регуляторная активность микроРНК; образование микрорибонуклеиновыми кислотами экзосом; двух-спиральность микроРНК. Вначале эти работы по микроРНК не вызвали отклика, но с 2000-х годов данное направление прочно утвердилось в современной молекулярной биологии. То, что своевременно исследования В.Г. Винтера не были замечены в научном мире, не должно снижать историческую ценность сделанных им находок.

1. Рукописи статей и других материалов представляются в редакцию на бумажном носителе (формат А4) или в электронном виде (на дискете или по электронной почте с обязательным уведомлением).
2. Текст набирается в Microsoft Word, шрифт — Times New Roman, размер шрифта — 12, межстрочный интервал — полуторный. Размещение на листе формата А4 со стандартными полями. Кроме текста статьи, добавляются сведения об авторе (ах): Ф.И.О., место работы, должность, научные степень и звание, адреса для переписки и электронной связи, номера факсов и телефонов). Необходимо сопроводительное письмо из учреждения.
3. Объем рукописи: оригинальные статьи — не более 12–14 стр. (в среднем 22000 знаков), не более 25 цитированных авторов; обзоры — не более 20–24 стр. (в среднем 40000 знаков), список литературы — не более 50 авторов. Требования к композиции рукописи: 1) оригинальные статьи — УДК, название, автор (ы), место работы, резюме на русском и английском языках, ключевые слова, введение, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение (выводы), литература, список сокращений; 2) краткие сообщения и обзоры строятся в виде сплошного текста, без вышеуказанных рубрикаций, со списком литературы, резюме на русском и английском языках; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде в формате TIF или JPEG. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале — литература на русском языке, затем — на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми

---

для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные правила.

6. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.
7. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.
8. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.
9. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном материале авторов.
10. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.
11. Адрес редакции указан на титульном листе журнала.
12. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию.
13. Имеется электронный архив журнала на сайте Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова ([www.biorosinfo.ru](http://www.biorosinfo.ru)).



Подписано к печати 30.10.2020  
Формат 60/90<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага офсетная № 1.  
Печать офсетная. Гарнитура Академия.  
Печ. л. 4,0. Тираж 1000 экз.

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

## ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР) создано в 2003 г., зарегистрировано Минюстом России.

Главными целями деятельности ОБР являются:

- содействие развитию биотехнологии в России как приоритетного направления научно-технического прогресса, основы повышения уровня жизни и благосостояния ее граждан;
- содействие сохранению научного и научно-технологического потенциала биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, достижению приоритета российской науки;
- обеспечение обмена научными идеями и научно-техническими достижениями, передовым производственным опытом;
- содействие развитию сотрудничества ученых, инженеров, специалистов с мировым научным и общественно-политическим сообществом;
- создание условий для творческой работы, роста профессионализма и компетентности, более полного использования интеллектуального потенциала членов организации в интересах развития науки и производства.

Для достижения этих целей ОБР осуществляет различные мероприятия, в том числе проводит конференции, симпозиумы, рабочие совещания. Регулярно проводится Съезд Общества биотехнологов России.

Издается журнал «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» совместно с Информационно-аналитическим центром медико-социальных проблем.

ОБР имеет отделения в 57 регионах России и объединяет свыше 3000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

ОБР тесно сотрудничает с Союзом биотехнологов и другими общественными и государственными организациями, научными и образовательными учреждениями по профилю.

Основой организационной деятельности ОБР являются региональные отделения, тесно взаимодействующие с Центральным Правлением и Секциями (экспертными группами).

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: [vestnik@biorosinfo.ru](mailto:vestnik@biorosinfo.ru); [www.biorosinfo.ru](http://www.biorosinfo.ru)