

**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),
К.Г. Скрябин (Москва), Э.К. Хуснутдинова (Уфа), Н.К. Янковский (Москва)

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

Зав. редакцией О.В. Коломбет

Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр

медико-социальных проблем»

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

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Василов* 4

Оригинальные статьи

Исследование влияния диэтилового эфира 1-диметилгидразинотолуол-3-окса-4-бензил-7-диметилгидразин фосфоновой кислоты (ДОБДФК) на интенсивность работы биоценозов на примере очистки сточных вод.

А.А. Фазуллина, Ю.А. Тужилкина, С.В. Фридланд 5

Применение дот-иммуноанализа для определения специфической активности антигенов в производстве холерной вакцины.

О.С. Дуракова, О.В. Громова, М.Н. Киреев, С.А. Воробьева, О.Д. Клокова, Л.Ф. Ливанова, Н.И. Белякова, О.А. Волох 10

Влияние температурных флуктуаций воды поверхностных водоемов города Ростова-на-Дону на циркуляцию холерных вибрионов.

Е.А. Меньшикова, И.В. Архангельская, Д.А. Левченко, Е.М. Курбатова, В.Д. Кругликов, С.В. Титова 14

Сравнительная оценка новых экспериментальных фагов и коммерческих фаговых препаратов для диагностики холеры.

Г.И. Коровкина, М.В. Овчинникова, Н.Е. Гаевская, О.С. Зинина 21

Способ получения препарата прямого термостабильного гемолизина (TDH) *Vibrio parahaemolyticus*.

М.В. Полеева, О.С. Чемисова, Р.В. Писанов, О.А. Цырулина 27

Биотехнологический потенциал Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН.

О.В. Турковская, А.Ю. Муратова, Е.В. Дубровская, С.Н. Голубев 33

Технология получения лиофилизированных композиций гидролизатов из гидробионтов.

Н.А. Голубь, В.И. Рябушко, Е.А. Бочарова 41

Антиоксическая активность противохолерного энтеросорбционного препарата в опытах *in vivo*.

М.В. Овчинникова, Е.Г. Абрамова, Т.Ю. Кириллова, И.А. Плотников, А.К. Никифоров, А.К. Адамов 48

Определение полной геномной последовательности бактериофагов *Vibrio cholerae*.

М.П. Погужова, Н.Е. Гаевская, Р.В. Писанов, А.С. Водопьянов, Л.В. Романова, С.О. Водопьянов, А.В. Тюрина, А.О. Кочеткова, С.Н. Головин 54

Получение, очистка, физико-химические свойства бактериоцина *Enterococcus faecium*.

В.М. Борзенков, М.Г. Теймуразов, В.И. Суворцев, В.П. Левчук, Ю.И. Хатюшин 59

Применение и биотехнологический способ получения сырья лекарственного растения – родиолы четырехраздельной.

А.Ю. Степанова, Е.А. Гладков, А.И. Соловьева 66

Обзоры

Применение протеолитических ферментов и нуклеаз в биомедицине и биотехнологии.

Е.Р. Заболоцкая, Д.О. Виноходов 71

Страницы истории. Юбилейные и знаменательные даты 2018 года 75

Правила для авторов 78

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

- Study of the effect of diethyl ether 1-dimethylhydrazinetoluol-3-oxa-4-benzylol-7-dimethylhydrazine of phosphonic acid (DOBDPA) the intensity of the biocenoses on the example of wastewater treatment.
A.A. Fazullina, J.A. Tuzhilkina, S.V. Fridland..... 5
- Application of dot-immunoanalysis for determination of the specific activity of antigens in manufacturing of cholera vaccine.
O.S. Durakova, O.V. Gromova, M.N. Kireev, S.A. Vorob'eva, O.D. Klokova, L.F. Livanova, N.I. Belyakova, O.A. Volokh..... 10
- Influence of temperature fluctuations of water from surface reservoirs of the city of Rostov-on-Don on the circulation of *Vibrio cholerae*.
Ye.A. Men'shikova, I.V. Arkhangel'skaya, D.A. Levchenko, Ye.M. Kurbatova, V.D. Kruglikov, S.V. Titova 14
- Comparative assessment of new experimental phages and commercial phage preparations for cholera diagnostics.
G.I. Korovkina, M.V. Ovchinnikova, N.E. Gaevskaya, O.S. Zinina 21
- Production of the thermostable direct hemolysin (TDH) of *Vibrio parahaemolyticus*.
M.V. Poleeva, O.S. Chemisova, R.V. Pisanov, O.A. Tsyrlina..... 27
- Biotechnological potential of the Collection of Rhizosphere Microorganisms IBFRM RAS.
O.V. Turkovskaya, A.Yu. Muratova, E.V. Dubrovskaya, S.N. Golubev 33
- Technology for producing lyophilized compositions of hydrolysates from hydrobionts.
N.A. Golub, V.I. Ryabushko, E.A. Bocharova 41
- Antitoxic activity of cholera enterosorption drug in vivo experiments.
M.V. Ovchinnikova, E.G. Abramova, T.Yu. Kirillova, I.A. Plotnikov, A.K. Nikiforov, A.K. Adamov 48
- Determination of the complete genomic sequence of bacteriophages *Vibrio cholerae*.
M.N. Pogozhova, N.E. Gaevskaya, R.V. Pisanov, A.S. Vodopyanov, L.V. Romanova, S.O. Vodopyanov, A.V. Tyurina, A.O. Kochetkova, S.N. Golovin 54
- Obtaining, purification, physico-chemical properties of the bacteriocin *Enterococcus faecium*.
V.M. Borzenkov, M.G. Teimurazov, V.I. Suroutsev, V.P. Levchuk, Y.I. Hatyushin 59
- Application and biotechnological method of obtaining raw materials of medicinal plants – *Rhodiola quadrifida*.
A.Yu. Stepanova, E.A. Gladkov, A.I. Solovyeva..... 66

Reviews

The use of proteolytic enzymes and nucleases in biomedicine and biotechnology.
E.R. Zabolotskaya, D.O. Vinohodov 71

Pages of history. Anniversary and significant dates 2018 75

Rules for authors 78

К читателям

В четвертом номере за 2018 год собраны разноплановые материалы для публикаций, отражающих многообразие интересов современных биотехнологов, молекулярных биологов и представителей смежных специальностей. При этом наибольшее число статей было представлено микробиологами, работающими с особо опасными инфекциями и другой инфекционной патологией.

Так, группа исследователей из Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», Саратов (Дуракова О.С. и др.) применила дот-иммуноанализ для определения специфической активности антигенов в производстве холерной вакцины, что позволило стандартизировать процесс ее изготовления.

Е.А. Меньшикова и др. (Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора) исследовали влияние температурных флуктуаций воды поверхностных водоемов города Ростов-на-Дону на циркуляцию холерных вибрионов. Г.И. Коровкина и др. из этого же института провели сравнительную оценку новых экспериментальных фагов и коммерческих фаговых препаратов для диагностики холеры.

М.В. Овчинникова и др. (Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов) сконструировали антитоксический энтеросорбент, обладающий высокой специфической нейтрализующей активностью в отношении экзотоксина холерного вибриона.

Авторский коллектив в составе М.П. Погожовой с коллегами из Ростовского-на-Дону противочумного института осуществили тщательное масштабное исследование «Определение полной геномной последовательности бактериофагов *Vibrio cholerae*» (Rostov-1 и Rostov-6).

М.В. Полеева с коллегами (Ростовский-на-Дону НИПЧИ) предложили способ получения и очистки препарата прямого термостабильного гемолизина (ТДН) *Vibrio parahaemolyticus*.

Обстоятельную высококвалифицированную работу «Получение, очистка, физико-химические свойства бактериоцина *Enterococcus faecium*» выполнила группа авторов (Борзенков В.М. и др.) из Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболенск Московской области).

Среди других направлений следует отметить работу коллектива сотрудников Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов (Турковская О.В. и др.), которые оценили биотехнологический потенциал Коллекции ризосферных организмов ИБФРМ РАН.

Ученые из Севастопольского Института морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН (Голубь Н.А., Рябушко В.И., Бочарова Е.А.) разработали технологию получения лиофилизированных композиций гидролизатов из гидробионтов и представили положительные результаты, свидетельствующие об их улучшенных органолептических показателях и повышенных сроках хранения.

В исследовании А.А. Фазуллиной с коллегами из Казанского национального исследовательского технологического университета изучено влияние биологически активного соединения диэтилового эфира ДОБДФК на физико-химические показатели воды при очистке сточных вод с помощью активизации работы биоценозов.

Сотрудники Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН А.Ю. Степанова и др. разработали технологию получения корневой культуры родиолы четырехраздельной и дали ее описание.

Е.Р. Заболоцкая, Д.О. Виноходов из Санкт-Петербургского государственного технологического института подготовили обзор «Применение протеолитических ферментов и нуклеаз в биомедицине и биотехнологии».

Наконец, в исторической рубрике печатаются материалы к памятным датам знаменитых молекулярных биологов – Артура Корнберга (100-летие) и Дейвида Балтимора (80-летие).

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

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДИЭТИЛОВОГО ЭФИРА 1-ДИМЕТИЛГИДРАЗИНОТОЛУОЛ-3-ОКСА-4-БЕНЗИЛОЛ-7- ДИМЕТИЛГИДРАЗИН ФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ (ДОБДФК) НА ИНТЕНСИВНОСТЬ РАБОТЫ БИОЦЕНОЗОВ НА ПРИМЕРЕ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД

А.А. ФАЗУЛЛИНА*, Ю.А. ТУЖИЛКИНА, С.В. ФРИДЛАНД

Казанский национальный исследовательский технологический университет

В статье изучено влияние растворов диэтилового эфира ДОБДФК в малых концентрациях на физико-химические показатели воды с целью определения возможности повышения активности биообъектов.

Ключевые слова: биологически активные вещества, физико-химические показатели, активный ил, сточная вода, химическое потребление воды.

Введение

Одной из основных проблем в экологии является загрязнение сточных вод. Вода — это самый ценный природный ресурс, без нее невозможно представить деятельность промышленных предприятий и бытовой жизни человека.

Наиболее частыми причинами загрязнения и ухудшения качества воды является сбрасывание воды предприятиями, в которой содержатся различные органические вещества, они начинают гнить, в результате чего развиваются болезнетворные бактерии. Поэтому важнейшей задачей инженерной экологии является очистка сточных вод, благодаря чему предотвращается нанесение вреда жизни и здоровью населения.

В настоящее время возросли требования к качеству очищенной сточной воды, которая сбрасывается в водоемы. Для этого необходим поиск новых возможностей и методов улучшения качества очищаемой сточной воды.

Существуют разнообразные методы очистки сточных вод: физические и химические, но существенная роль отводится биологическим методам. Метод биологической очистки получил широкое при-

менение не только на промышленных производствах, но также метод показывает высокую эффективность при очистке коммунально-бытовых стоков. Данный метод основан на способности микроорганизмов использовать для питания растворенные органические вещества, которые содержатся в сточных водах. Однако современные сооружения для биологической очистки не справляются с нагрузкой и с требованиями к качеству очищенной воды. Поэтому требуется создание новых усовершенствованных технологий и схем для биологической очистки сточных вод. Процесс усовершенствования связан с интенсификацией очистки за счет введения веществ, которые проявляют биологическую активность.

Из литературных источников известно, что многие природные и синтетические биологически активные вещества (БАВ) проявляют свою эффективность в сверхмалых концентрациях [2, 3]. В связи с этим ранее были исследованы некоторые вещества на биологическую активность. Интерес представляли соединения, как ускоряющие работу биоценозов активного ила при очистке сточных вод, так и препятствующие развитию плесени. Известно, что на положительное развитие биообъектов влияют такие физико-химические показатели, как рН, ОВ-потенциал, поверхностное натяжение [4].

Целью настоящей работы является изучение влияния соединения диэтилового эфира ДОБДФК на биологическую очистку сточных вод в аэробных условиях в развитии направления исследований [5], проведенных ранее.

© 2018 г. Фазуллини А.А., Тужилкина Ю.А., Фридланд С.В.

* **Автор для переписки:**

Фазуллини Алсу Асгатовна

ассистент кафедры инженерной экологии Казанского национального исследовательского технологического университета

E-mail: rialai@mail.ru

Как было показано прежде в ряде работ [6, 7], соединения, проявляющие биологическую активность в малых концентрациях, вызывают изменения физико-химических показателей воды, а именно: рН, ОВ-потенциал, поверхностное натяжение. В связи с этим в настоящей работе предварительно изучено влияние диэтилового эфира ДОБДФК по упомянутым показателям с последующим определением влияния на биоценоз активного ила.

Материалы и методы

Для приготовления необходимых концентраций и проведения опыта использовалась только свежеприготовленная дистиллированная вода. Растворы необходимых исследуемых веществ готовились методом последовательных серийных разбавлений. Рабочие концентрации составляли 10^{-1} – 10^{-8} г/дм³.

Измерение поверхностного натяжения определялось с помощью полустатического метода давления газового пузырька. Опыт проводился на приборе П.А. Ребиндера по стандартной методике [1].

Для определения величины рН использовали лабораторный рН-метр марки «ЛП-58». ОВ-потенциал определяли, пользуясь тем же прибором, но переключая прибор на соответствующую шкалу измерений.

Предварительное исследование физико-химических показателей, а главное: характер их зависимости от концентраций позволили предположить, что диэтиловый эфир ДОБДФК окажет биологическую активность.

Для определения химического потребления кислорода (ХПК) активный ил для опыта был отобран со стадии регенерации при биологической очистке сточных вод ПАО «Казаньоргсинтез». Сточная вода отбиралась из лотка перед подачей в аэротенк и представляла собой мутную жидкость серо-желтоватого цвета с резким запахом.

Для проведения опыта использовались 4 конические колбы объемом на 250 мл с исследуемым веществом в определенной концентрации и 4 колбы для контроля, в которые препарат не добавлялся.

Перед началом эксперимента в каждую колбу дозировалось по 50 мл сточной воды, 30 мл активного ила и биологически активное вещество в количестве, необходимом для достижения нужной концентрации. В контрольные пробы анализируемое вещество не добавлялось. По завершении дозирования колбы помещались на вибростенд и анализ осуществлялся через определенные промежутки времени (1 час).

Для проведения эксперимента был выбран ускоренный метод определения химического потребления кислорода [8].

Результаты и обсуждение

Для измерения поверхностного натяжения за стандартную жидкость была взята дистиллированная вода с показателями $= 72,86 \cdot 10^{-3}$ Н/м $= 5,2$ см. Полученные результаты измерений приведены на рисунке 1.

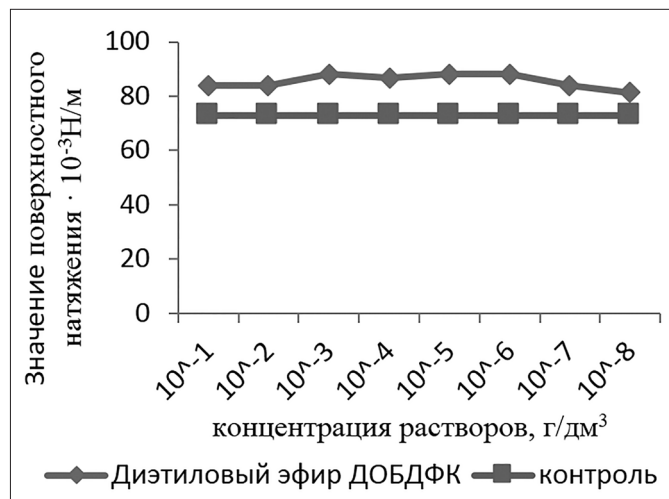


Рис. 1. Зависимость поверхностного натяжения растворов БАВ от концентрации

По экспериментальным данным видно, что диэтиловый эфир ДОБДФК в концентрации 10^{-5} г/дм³ влияет на значение поверхностного натяжения, которое равно $88,27 \cdot 10^{-3}$ Н/м, а уже в концентрации 10^{-8} г/дм³ значение поверхностного натяжения становится ниже и составляет $81,27 \cdot 10^{-3}$ Н/м. Снижение значения поверхностного натяжения воды при добавлении солей оказывает положительное влияние на развитие биообъектов, находящихся в водной среде.

Для измерения значения рН и ОВ-потенциала использовалась свежеприготовленная дистиллированная вода, для которой значение величины рН составляло 5,97, а значение ОВ-потенциала — 81 мВ.

Для растворов того же вещества при различных концентрациях результаты представлены на рисунках 2 и 3. В ходе проведенного опыта значение величины рН лежало в диапазоне от 3,92 до 7,06. Максимальное значение рН = 7,06 достигалось в концентрации 10^{-5} г/дм³.

Из результатов, представленных на рисунке 3, видно, что соединение в рассматриваемых концентрациях уменьшает значение ОВ-потенциала.

Опыт для определения значения ХПК проводился с использованием препарата в аэробных условиях. В работе сравнивались результаты процесса очистки сточной воды в присутствии исследуемого вещества в концентрации 10^{-5} – 10^{-8} г/дм³ и без него. В ходе эксперимента использовалась сточная вода со значением ХПК=820 мгО₂/дм³. Результаты эксперимента представлены в виде графика зависимости показателя значения ХПК от времени.

В ходе эксперимента сравнивались значения процесса очистки в присутствии соединения в концентрации 10^{-5} г/дм³ и без него. Результаты приведены на рисунке 4.

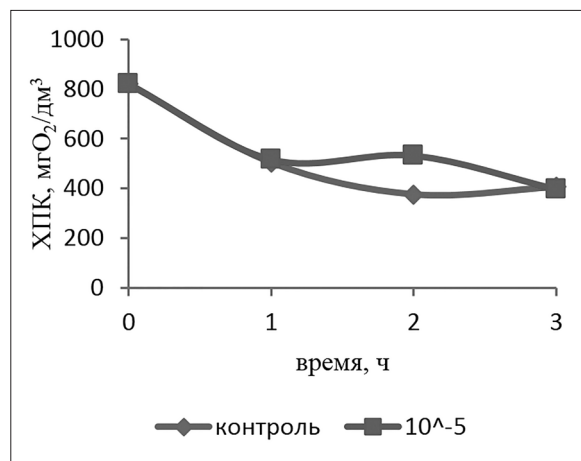


Рис. 4. Изменение значения ХПК очищаемой воды при добавлении диэтилового эфира ДОБДФК в концентрации 10^{-5} г/дм³ в сравнении с контролем

В следующем эксперименте рассматривался препарат в концентрациях 10^{-6} г/дм³ и 10^{-7} г/дм³, результаты представлены на рисунках 5 и 6.

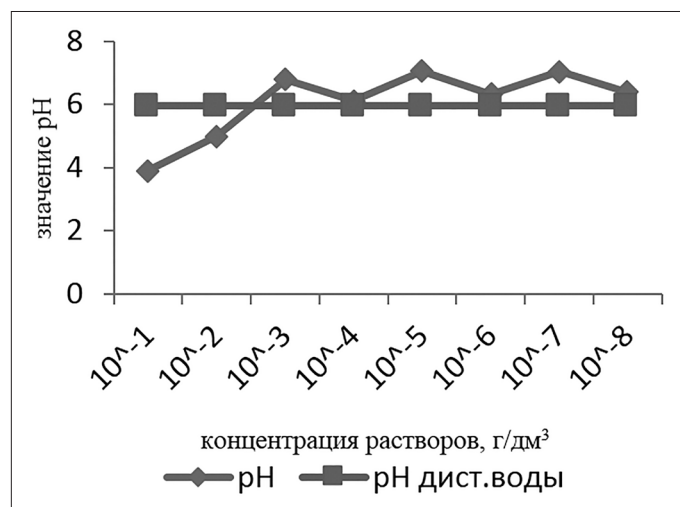


Рис. 2. Зависимость значения величины pH от концентрации

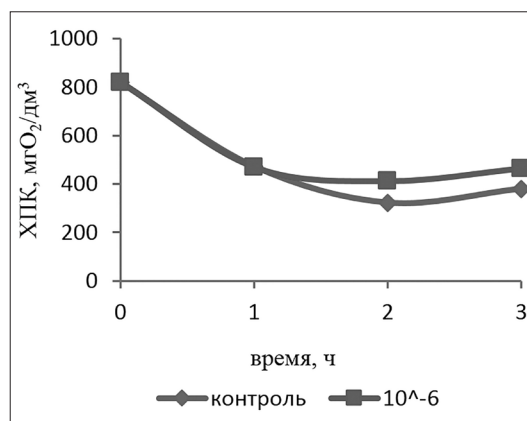


Рис. 5. Изменение значения ХПК очищаемой воды при добавлении диэтилового эфира ДОБДФК в концентрации 10^{-6} г/дм³ в сравнении с контролем

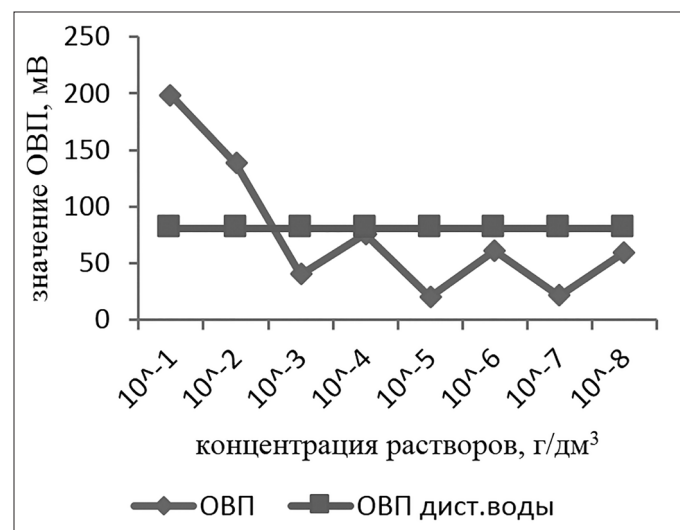


Рис. 3. Зависимость значения ОВ-потенциала раствора от концентрации

Из экспериментальных данных, отображенных на рисунке 4, видно, что по достижении второго часа препарат оказывает отрицательное влияние.

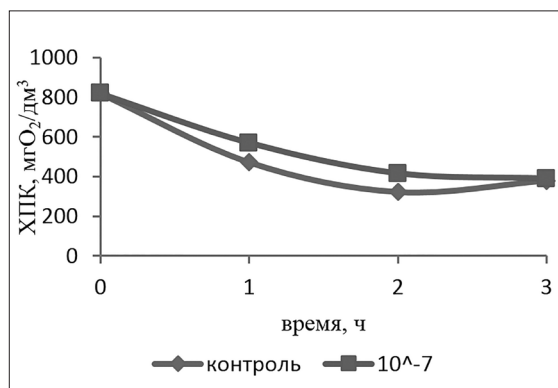


Рис. 6. Изменение значения ХПК очищаемой воды при добавлении диэтилового эфира ДОБДФК в концентрации 10^{-7} г/дм³ в сравнении с контролем

По полученным результатам можно сделать вывод о том, что препарат в концентрации 10^{-6} г/дм³ оказывает влияние в первый час аэрирования. Препарат в концентрации 10^{-7} г/дм³ оказывает отрицательное влияние в течение трех часов аэрирования.

Следующий эксперимент был проведен с соединением в концентрации 10^{-8} г/дм³. Результаты представлены на рисунке 7.

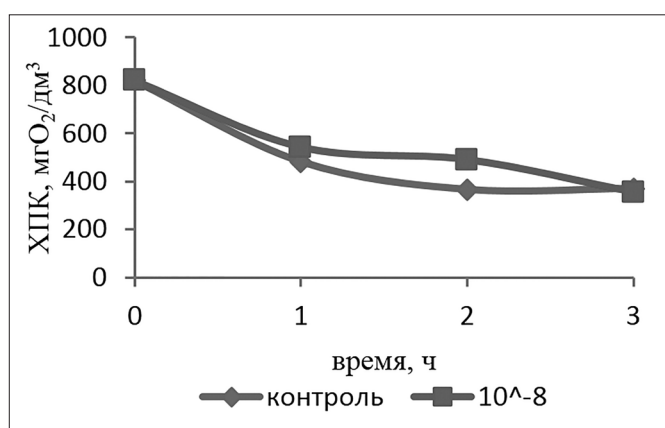


Рис. 7. Изменение значения ХПК очищаемой воды при добавлении диэтилового эфира ДОбДФК в концентрации 10^{-8} г/дм³ в сравнении с контролем

При внесении препарата в концентрации 10^{-8} г/дм³ наилучшая очистка происходит к третьему часу аэрирования.

Заключение

На основании проведенной работы можно сделать следующие выводы:

- Усовершенствование процесса биологической очистки сточных вод связано с введением и применением биологически активных веществ, которые позволяют ускорять или замедлять рост и развитие биообъектов.

- В данной работе были исследованы соединения диэтилового эфира ДОбДФК на степень их биологической активности. В процессе исследования были измерены физико-химические показатели, такие как рН, ОВ-потенциал, поверхностное натяжение.

- Изменение ОВ-потенциала, рН, снижение поверхностного натяжения растворов вещества диэтилового эфира ДОбДФК положительно влияют на интенсификацию биологических процессов очистки. По изменениям физико-химических показателей можно судить об этом соединении как БАВ.

- Исходя из полученных значений ХПК, можно утверждать, что под влиянием этого соединения в аэробных

условиях в концентрациях 10^{-1} – 10^{-8} г/дм³ на протяжении трех часов аэрирования происходит замедление процесса и оно может быть использовано для замедления роста и развития биообъектов, отрицательно влияющих на их состояние.

Литература

1. Анирид гидроксиметиланилинометилфосфиновой кислоты (Амидофос) в качестве биостимулятора активного ила в процессе очистки сточных вод и способ его получения. Т.П. Павлова, О.С. Рощина, С.В. Фридланд, 2013. Патент № 2488587.
2. Бурлакова Е.Б. Фосфинатные соединения, проявляющие биологическую активность // Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева. — 1999. — Т. 43. — № 5. — С. 3–11.
3. Бурлакова Е.Б. Биологическая активность соединений, содержащих фосфинатные и аминные группировки // Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева. — 2007. — Т. 51. — № 1. — С. 3–12.
4. Гиляева Г.В., Никонорова В.Н., Фридланд С.В., Павлова Т.П. Исследование влияния препарата «Этафос-Ф» в сверхнизких концентрациях на процесс биологической очистки сточных вод ПАО «НКНХ» // Вестник Казанского технологического университета — 2016. — Т. 19. — № 5. — С. 146–148.
5. Горбачук В.В., Сироткин В.А., Сулов Д.А., Никитин Е.В. Практическое руководство к лабораторным работам по коллоидной химии. — Казань: Издательство Казанского университета, 2001. — 83 с.
6. Коновалов А.И. Образование наноразмерных молекулярных ансамблей в высокоразбавленных водных растворах // Вестник РАН. — 2013. — Т. 83. — № 12. — С. 1076–1082.
7. Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. — М.: Химия, 1984. — 453 с.
8. Пантюкова М.Е., Мазлова С.В., Павлова Т.П., Шулаев М.В., Фридланд С.В. Интенсификация биологической очистки сточных вод стимуляторами процесса // Безопасность жизнедеятельности. — 2011. — № 3(123). — С. 31–34.

Список сокращений

ДОбДФК — 1-диметилгидразинотолуол-3-окса-4-бензил-7-диметилгидразин фосфоновой кислоты,

ОВ — окислительно-восстановительный,

ХПК — химическое потребление кислорода,

БАВ — биологически активное вещество.

**STUDY OF THE EFFECT OF DIETHYL ETHER
1-DIMETHYLHYDRAZINETOLUOL-3-OXA-4-BENZYLOL-7-
DIMETHYLHYDRAZINE OF PHOSPHONIC ACID (DOBDPA)
THE INTENSITY OF THE BIOCENOSES ON THE EXAMPLE
OF WASTEWATER TREATMENT**

A.A. FAZULLINA, J.A. TUZHILKINA, S.V. FRIDLAND

Kazan National Research Technological University

The article studies the effect of DOBDPA diethyl ether solutions in low concentrations on the physicochemical parameters of water in order to determine the possibility of increasing the activity of bio-objects.

Keywords: biologically active substances, physical and chemical parameters, activated sludge, waste water, chemical oxygen demand.

ПРИМЕНЕНИЕ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИГЕНОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ ХОЛЕРНОЙ ВАКЦИНЫ

О.С. ДУРАКОВА*, О.В. ГРОМОВА, М.Н. КИРЕЕВ, С.А. ВОРОБЬЕВА,
О.Д. КЛОКОВА, Л.Ф. ЛИВАНОВА, Н.И. БЕЛЯКОВА, О.А. ВОЛОХ

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

Для определения количественного содержания антигенов холерного вибриона в процессе производства вакцины холерной бивалентной химической, таблеток, покрытых кишечнорастворимой оболочкой, предлагается использовать метод дот-иммуноанализа (ДИА) с применением конъюгата на основе стафилококкового белка А и наночастиц коллоидного золота. Данный вариант ДИА позволяет проводить быстрый сравнительный анализ антигенной активности разных компонентов вакцины и выражать ее в сопоставимых условных единицах. Предлагаемый нами метод даст возможность стандартизировать процесс изготовления холерной вакцины.

Ключевые слова: холерная вакцина, антигены, коллоидное золото.

Введение

Холерная химическая вакцина, разработанная в РосНИПЧИ «Микроб» и зарегистрированная на территории России, состоит из холерогена-анатоксина и О-антигенов (О-АГ) холерного вибриона сероваров Инаба и Огава [4].

В настоящее время актуальной проблемой является повышение эффективности и стандартности существующих вакцинных препаратов. Для холеры важной задачей представляется усовершенствование оральных химических вакцин путем оптимизации биотехнологических этапов производства и внедрения современных технологий определения содержания и стандартизации антигенов, входящих в состав вакцинных препаратов.

Для определения специфической активности антигенов, входящих в состав активных компонентов холерной вакцины, в настоящее время используют серологические методы, которые основаны на определении антигенной активности в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) и в реакции диффузионной преципитации в геле (РДП) [6]. Постановка данных реакций достаточно трудоемка и длительна по времени, а в случае РДП

малоинформативна. Поскольку коммерческие наборы по определению специфической активности О-антигена и холерогена отсутствуют, то разработка и внедрение информативных экспрессных методов контроля продукции основных иммуногенов холерного вибриона в процессе производства вакцины актуальны.

Нами проведено изучение возможности применения высокочувствительного, технически простого и легко воспроизводимого экспресс-метода (ДИА) для оценки активности холерогена-анатоксина и О-антигена в специфических фракциях холерной химической вакцины в процессе производства и контроля [7].

Материалы и методы

В работе использовали антигенные препараты — лиофилизированные, специфически стерильные активные компоненты холерной вакцины (О-АГ, холероген-анатоксин), выделенные из культуральной жидкости путем концентрирования и осаждения сернокислым аммонием; специфические сыворотки: коммерческая сыворотка диагностическая холерная О1 адсорбированная сухая для РА и антихолерогенная сыворотка — стандартный образец предприятия. Начальная концентрация антигенсодержащих полуфабрикатов составляла 5 мг/мл.

Дот-иммуноанализ с антивидовыми антителами, мечеными пероксидазой (ДИА Н⁺) осуществляли по стандартной методике [7] и разработанному варианту с использованием конъюгата на основе стафилококко-

© 2018 г. Дуракова О.С., Громова О.В., Киреев М.Н., Воробьева С.А., Клокова О.Д., Ливанова Л.Ф., Белякова Н.И., Волох О.А.

* Автор для переписки:

Дуракова Оксана Сергеевна

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

E-mail: lhv@microbe.ru

вого белка А, меченного наночастицами коллоидного золота диаметром частиц 15–17 нм (ДИА КЗ). Для приготовления конъюгата использовали стафилококковый белок А («Сигма»), коллоидный раствор золота, полученный по методу G. Frens [9]. Конъюгацию с белком А проводили по методу, описанному ранее [1]. Постановка анализа заключалась в нанесении на нитроцеллюлозную мембрану антигенов, инкубирования подложки в специфической сыворотке и выявления связавшихся с антигеном антител стафилококковым белком А, меченным наночастицами коллоидного золота. Учет результатов в обоих случаях проводили визуально, сразу после проявления пятен. За титр препарата антигена принимали то наибольшее разведение, при котором регистрировали четко различимое пятно.

Статистическую обработку результатов проводили по методу Пирсона [5] с помощью «Microsoft Excel 2010» («Microsoft Corporation», США).

Результаты и обсуждение

Был проведен анализ специфической активности фракций О-АГ и холерогена-анатоксина с

помощью методов ДИА, РНГА и РДП. На первом этапе работы были получены экспериментальные серии конъюгатов на основе белка А стафилококка и коллоидного золота в качестве метки. Наночастицы коллоидного золота диаметром 15–17 нм обеспечивают прочное адсорбционное взаимодействие с белковыми молекулами.

Далее был проведен анализ специфической активности О-АГ нормируемыми методами РДП, РНГА и двумя вариантами ДИА. Полученные данные представляют средние показатели 3–6 определений. Время постановки составляло 120 мин для ДИА КЗ и 180 мин для ДИА Н⁺.

Было установлено, что результаты, полученные предложенным методом ДИА с использованием коллоидного золота, коррелируют с результатами, полученными в РДП и РНГА. Коэффициент корреляции составляет 0,79, а по стандартной методике — 0,58 (табл. 1).

На следующем этапе работы определяли активность холерогена-анатоксина в специфических фракциях холерной вакцины. Корреляция между РДП и ДИА КЗ составляет 0,9, а в ДИА Н⁺ — 0,76 (табл. 2).

Таблица 1

Активность О-антигена в специфических фракциях

№ пробы	ДИА		*РДП	*РНГА
	*КЗ	*Н ⁺		
1	640±61	640±61	64±8	1194±116
2	1600±176	1024±80	64±8	6144±308
3	640±61	512±48	256±24	4778±404
4	1024±80	1024±80	256±24	4096±380
5	640±64	640±65	256±24	2048±198
6	1024±80	512±52	8±1	2730±236
7	640±61	320±36	64±8	2048±198
8	320±36	160±24	64±8	853±64
9	1024±101	640±62	8±1	3584±165
10	512±52	256±24	64±8	2560±220

Примечание: * — реципрокный титр

Таблица 2

Активность холерогена-анатоксина в полуфабрикатах вакцины

№ пробы	ДИА		*РДП
	*КЗ	*Н ⁺	
1	1056±101	512±42	128±11
2	256±24	128±11	64±8
3	128±11	64±6	32±4
4	256±24	64±8	64±8
5	256±25	128±11	128±11

Примечание: * — реципрокный титр

Результаты, полученные двумя методами ДИА, в некоторых случаях разнятся, причем метод с использованием белка А, меченного коллоидным золотом, показывает больший титр антигена в образце, что может быть связано с большей чувствительностью метода за счет свойств коллоидного золота. Свойства коллоидного золота позволяют получить четкие результаты специфических реакций за счет его интенсивного окрашивания и визуализировать результаты анализа непосредственно после взаимодействия исследуемого образца с диагностикумом; следовательно, не требуется дополнительная стадия субстратного проявления, как в ДИА Н⁺. Преимущества применения коллоидного золота в качестве метки описаны рядом авторов [2, 3, 8]. ДИА КЗ — это простой и высокочувствительный метод, дающий возможность одновременно тестировать большое количество образцов на небольшом участке мембраны и в короткие сроки определять количественное содержание специфических антигенов. Известно, что многие из коллоидных металлов являются активными катализаторами и потенциально способны в индикаторных реакциях обеспечить усиление сигнала на несколько (1–3) порядков в сравнении с ферментными маркерами; тем самым значительно повышается чувствительность точечного твердофазного иммунного анализа.

Таким образом, в ходе проведенного исследования доказана возможность применения ДИА для оценки активности антигенов в полуфабрикатах вакцины. Впервые нами предлагается применять ДИА с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А и коллоидного золота для определения специфических антигенов. Полученные данные при постановке ДИА в двух вариантах коррелируют с результатами уже используемых в производстве методов оценки активности антигенов.

Заключение

В результате выполнения настоящего исследования были получены экспериментальные серии конъюгатов на основе белка А стафилококка и коллоидного золота в качестве метки и проведен анализ различных антигенов холерной вакцины. Необходимо отметить преимущество предлагаемого метода. Для проведения данного варианта ДИА требуется всего 2 мкл материала, время анализа не более 2 часов, учет результатов визуальный. Процедура получения и применения иммуноконъюгата проста и универсальна, имеется возможность исследования разных антигенов при наличии

специфических сывороток или иммуноглобулинов. Кроме того, так как в настоящее время нет единого метода определения активности антигенов на этапах получения лиофилизированных полуфабрикатов холерной химической вакцины, использование предложенного варианта ДИА позволяет стандартизировать определение активности различных фракций.

Таким образом, при соблюдении стандартных условий постановки реакции ДИА КЗ открывается возможность проводить быстрый сравнительный анализ активности разных антигенов и выражать ее в сопоставимых условных единицах. Предлагаемый нами метод позволит оптимизировать процесс изготовления компонентов холерной вакцины.

Литература

1. Громова О.В., Полунина Т.А., Балашова Е.В. и др. Применение реакции коагутинации для контроля синтеза О-антигенов производственных штаммов *Vibrio cholerae* при глубинном культивировании // Проблемы особо опасных инфекций. — 2003. — Вып. 86. — С. 148–153.
2. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю. и др. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинские применения. — М.: Наука, 2008.
3. Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Калиновский А.И. и др. Использование специфических антител, меченных частицами коллоидного золота для обнаружения антигенов бруцелл методом дот-иммуноанализа // Микробиология. — 1998. — № 6. — С. 64–68.
4. Кутырев В.В., Шуковская Т.Н. Холерные вакцины / В кн.: Вакцины и вакцинация: национальное руководство — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. — С. 431–445.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — С. 350.
6. Фармакопейная статья [Электронный ресурс]. URL: <http://pharmacopeia.ru/fs-3-3-1-0020-15-vaktsina-holernaya-bivalentnaya-himicheskaya-tabletki-pokrytye-kishechnorastvorimoi-obolochkoj>.
7. Федорова В.А., Сырова Н.А., Громова О.В. и др. Применение дот-иммуноанализа для контроля синтеза иммуногенов при производстве оральной химической холерной вакцины // Биотехнология. — 2000. — № 4. — С. 87–94.
8. Шарапова Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К. и др. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологического антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе // Проблемы особо опасных инфекций. — 2010. — № 1(103). — С. 63–66.
9. Frens G. Controlled nucleation for the particle size in monodisperse gold suspension // Nature Phys. Sci. — 1973. — Vol. 241(1). — P. 20–22.

**APPLICATION OF DOT-IMMUNOANALYSIS FOR DETERMINATION
OF THE SPECIFIC ACTIVITY OF ANTIGENS IN MANUFACTURING
OF CHOLERA VACCINE**

O.S. DURAKOVA, O.V. GROMOVA, M.N. KIREEV, S.A. VOROB'eva, O.D. KLOKOVA,
L.F. LIVANOVA, N.I. BELYAKOVA, O.A. VOLOKH

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov

To determine the quantitative content of cholera vibrio antigens in the process of manufacturing of bivalent chemical cholera vaccine, enteric-coated tablets, it is proposed to use the dot-immunoassay (DIA) using a conjugate of gold nanoparticles with staphylococcal protein A. This variant of DIA allows for the rapid comparative analysis of antigenic activity of different vaccine components, and for expressing it in compatible conventional units. The method proposed will permit us to standardize the process of cholera vaccine production.

Keywords: cholera vaccine, antigens, colloidal gold.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ФЛУКТУАЦИЙ ВОДЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ ГОРОДА РОСТОВА-НА-ДОНУ НА ЦИРКУЛЯЦИЮ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Е.А. МЕНЬШИКОВА*, И.В. АРХАНГЕЛЬСКАЯ, Д.А. ЛЕВЧЕНКО,
Е.М. КУРБАТОВА, В.Д. КРУГЛИКОВ, С.В. ТИТОВА

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

Температура является одним из основных факторов, влияющих на частоту обнаружения и численность вибрионов. Геофизические исследования, проведенные в Ростовской области, отмечают климатические изменения в регионе, в частности, рост температуры в весенне-осенний период и снижение количества осадков, что может оказать благоприятный эффект на развитие патогенной вибриофлоры. В г. Ростове-на-Дону в поверхностных водоемах наблюдается тенденция к увеличению амплитуды колебаний средне-сезонной температуры, что, в свою очередь, приводит к увеличению процентов высеваемости культур холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп. Кроме того, нами отмечено обнаружение штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы, так же, как и *V. cholerae* nonO1/nonO139, в температурном диапазоне от $19,8 \pm 0,9$ до $25,2 \pm 1,1$ °С.

Ключевые слова: температура, климатические изменения, средне-сезонная температура, холерный вибрион.

Введение

Холера продолжает оставаться значимой проблемой для здравоохранения многих стран мира, при этом мониторинг контаминации холерными вибрионами поверхностных водоемов и других объектов окружающей среды является неотъемлемой частью эпидемиологического надзора за этой инфекцией [6]. Существует мнение, что температура является одним из основных факторов, влияющих на частоту обнаружения и численность вибрионов [13, 15, 16, 17]. По данным метеорологических наблюдений, средняя температура поверхности Земли за последние 100 лет возросла на $0,74$ °С, что привело к нарушению водного режима пресноводных водоемов, катастрофическим наводнениям и локальному изменению наземных и водных экосистем в различных частях мира [1, 14, 18].

За последние десять лет эпидемиологическую ситуацию по холере на территории Российской Федерации характеризовали имевшие место заносы этой инфекции с эндемичных территорий без распростране-

ния (2010 г., 2012 г., 2014 г.), а также не связанные с ними единичные случаи обнаружения в объектах окружающей среды токсигенных, наряду с ежегодным выделением десятков нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы без эпидосложнений по холере [7, 8, 9, 12].

При анализе многолетних данных о циркуляции холерных вибрионов в объектах окружающей среды стоит отметить, что наибольшее количество штаммов различной эпидзначимости было обнаружено на территории Южного федерального округа, а территория Ростовской области заняла второе место по количеству выделенных штаммов холерных вибрионов из рек Дон и Темерник [2]. Следует отметить, что поверхностные водоемы г. Ростова-на-Дону (крупного мегаполиса) подвергаются воздействию множества абиотических и биотических факторов. Ранее нами была выявлена прямая сильная корреляционная связь между средне-квартальной летней температурой на территории Ростовской области и количеством выделенных штаммов *Vibrio cholerae* [3]. Кроме того, геофизические исследования отмечают климатические изменения в регионе, в частности, рост температуры в весенне-осенний период и снижение количества осадков [10], что, по нашему мнению, может оказать благоприятный эффект на развитие патогенной вибриофлоры.

В этой связи целью настоящего исследования явился анализ влияния температурных флуктуаций воды рек

© 2018 г. Меньшикова Е.А., Архангельская И.В., Левченко Д.А., Курбатова Е.М., Кругликов В.Д., Титова С.В.

* Автор для переписки:

Меньшикова Елена Аркадьевна
кандидат биол. наук, руководитель группы экологии холерных вибрионов, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

E-mail: super.monika2007@yandex.ru

Дон и Темерник на обнаружение холерных вибрионов в период с 2013 по 2017 гг.

Материалы и методы

В работе были использованы данные мониторинговых исследований проб воды по двум стационарным точкам г. Ростова-на-Дону: река Дон, правый берег (Державинский спуск) и река Темерник (Ботанический сад, у моста), с мая по сентябрь включительно, в период с 2013 по 2017 гг. Измерение температуры воды в стационарных точках отбора проводили непосредственно перед забором пробы в одно и то же время, в утренние часы (с 8.00 до 9.00).

Выделение и идентификацию штаммов холерных вибрионов осуществляли в соответствии с методическими указаниями и санитарными правилами [5, 11].

Статистическую обработку полученных результатов данного исследования проводили с помощью компьютерной программы «STATISTICA» (StatSoft Russia) и с использованием параметрических методов с вычислением средних арифметических, среднего квадратичного отклонения, ошибок средних. Расчет и достоверность коэффициента корреляции оценивали с помощью метода Пирсона для установления наличия и размера связи [4].

Качественную силу связи между явлениями оценивали по величине значений коэффициентов корреляции (табл. 1).

Таблица 1

Оценка степени корреляции

Степень корреляции	Величина коэффициента
Слабая (низкая)	от 0 до 0,29
Средняя	от 0,3 до 0,69
Сильная (высокая)	от 0,7 до 1,0

По направленности связь оценивали как прямую или обратную. Если при увеличении (или уменьшении) одного явления наблюдалось увеличение (уменьшение) другого, связанного с ним явления, то связь оценивалась как прямая и коэффициент корреляции был со знаком «плюс». Если с увеличением одного явления другое уменьшается, то связь — обратная и коэффициент корреляции — со знаком «минус».

Процент высеваемости штаммов *V. cholerae* рассчитывали по соотношению положительных результатов

на наличие холерных вибрионов к общему количеству исследованных проб.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного ретроспективного анализа температуры (T °С) воды в р. Дон за изучаемый период установлено, что минимальная средне-сезонная температура отмечена в 2017 г. и составила $20,5 \pm 1,4$ °С, а максимальная в 2016 г. — $22,8 \pm 1,2$ °С. Исходя из полученных данных, выявлена амплитуда колебания средне-сезонной температуры за пятилетний период, которая составила $2,3$ °С. При расчете средне-месячной температуры воды в р. Дон за пятилетний период наибольшая температура зарегистрирована в июле и августе ($24,2 \pm 0,6$ и $24,4 \pm 0,7$, соответственно). Обращает на себя внимание факт увеличения температуры воды на $1,7$ °С в августе и на $1,9$ °С в сентябре (в 2017 г. по сравнению с 2013 г.) (табл. 2).

В этот же период при анализе температурных показателей воды р. Темерник обнаружена менее интенсивная амплитуда колебания средне-сезонной температуры — $0,4$ °С, в сравнении с аналогичными показателями в р. Дон. При расчете среднемесячной температуры воды в р. Темерник за изучаемый период наибольшая температура зарегистрирована в августе ($22,8 \pm 1,1$). Вместе с тем отмечен рост температурных показателей в августе и сентябре 2017 г., что на $2,5$ °С и $4,1$ °С, соответственно, выше в сравнении с этими же месяцами в 2013 г. (табл. 3).

При изучении влияния температуры на циркуляцию штаммов холерных вибрионов установлено, что выделение *V. cholerae* nonO1/nonO139 в исследуемых стационарных точках сочеталось со среднестатистической температурой воды более $19,8 \pm 0,9$ °С. В ходе мониторинговых исследований поверхностных водоемов установили, что пик выделения культур холерных вибрионов nonO1/nonO139 приходился на диапазон температур от $22,0 \pm 0,3$ до $26,0 \pm 0,7$ °С в реке Дон и от $21,6 \pm 0,5$ до $24,8 \pm 1,3$ °С — в реке Темерник.

Наряду с ежегодным выделением из воды исследуемых точек *V. cholerae* nonO1/nonO139 отмечены единичные случаи обнаружения холерных вибрионов O1 серогруппы. Так, в реке Дон в июле 2013 года был изолирован нетоксигенный штамм *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa (*ctxAB-tcpA-*) при температуре воды $25,6 \pm 0,5$ °С, в 2015 году из этой точки был выделен штамм *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa (*ctxAB-tcpA-*) при температуре $24,3 \pm 0,7$ °С (рис. 1).

Таблица 2

**Динамика среднемесячной температуры воды в стационарной точке —
р. Дон, правый берег, Державинский спуск**

Год \ Месяц	Среднемесячная температура (Т °С) воды р. Дон ± ошибка средней					Средне-сезонная температура воды (Т °С) ± ошибка средней
	май	июнь	июль	август	сентябрь	
2013	19,8±0,9	22,6±0,4	25,6±0,5	23,3±0,5	17,6±1,3	21,7±1,1
2014	19,5±1,5	22,0±0,3	22,5±0,9	26,0±0,7	18,4±1,2	21,7±1,1
2015	16,0±1,3	23,3±0,7	24,3±0,7	23,0±1,1	21,0±1,4	21,5±1,2
2016	19,6±0,7	25,2±1,1	25,9±0,3	24,5±0,3	18,8±1,2	22,8±1,2
2017	15,0±1,5	20,8±0,9	22,8±0,8	25,0±0,8	19,5±1,2	20,5±1,4
Среднее	18,0±0,8	22,8±0,7	24,2±0,6	24,4±0,7	19,1±1,3	21,6±1,2

Таблица 3

**Динамика среднемесячной температуры воды в стационарной точке —
р. Темерник, Ботанический сад, у моста**

Год \ Месяц	Среднемесячная температура (Т °С) воды р. Темерник ± ошибка средней					Средне-сезонная температура воды (Т °С) ± ошибка средней
	май	июнь	июль	август	сентябрь	
2013	19,8±0,9	21,8±0,8	22,0±1,0	22,3±0,6	15,2±1,2	20,0±1,0
2014	19,5±1,0	20,8±0,4	21,1±0,3	23,3±1,2	15,8±1,0	20,1±1,0
2015	15,3±1,3	22,0±0,5	21,0±1,0	22,4±1,8	19,5±1,6	20,0±1,0
2016	19,3±0,9	22,8±1,0	21,7±1,0	21,4±0,6	17,1±1,2	20,4±0,6
2017	15,0±0,8	19,0±1,4	21,6±0,5	24,8±1,3	19,3±1,2	20,0±1,1
Среднее	17,8±1,0	21,3±0,6	21,5±0,8	22,8±1,1	17,4±1,2	20,1±0,9

При проведении мониторинговых исследований на холеру в стационарной точке — река Темерник, Ботанический сад, у моста в 2013 г. также был изолирован штамм *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa (*ctxAB*- *tcpA*-) при температуре воды 19,8±0,9 °С. Обращает на себя внимание факт выделения нетоксигенного штамма холерного вибриона из реки Темерник в 2013 году при температуре

воды на 5,8 °С ниже в сравнении с температурой в реке Дон. В 2014 г. в вышеуказанной стационарной точке был изолирован токсигенный штамм *V. cholerae* O1 El Tor Inaba (*ctxAB*+*tcpA*+) при температуре 21,1±0,3 °С. Следует отметить, что трехкратные заборы материала в этой точке не приводили к повторному обнаружению штаммов *V. cholerae* O1 (рис. 2).

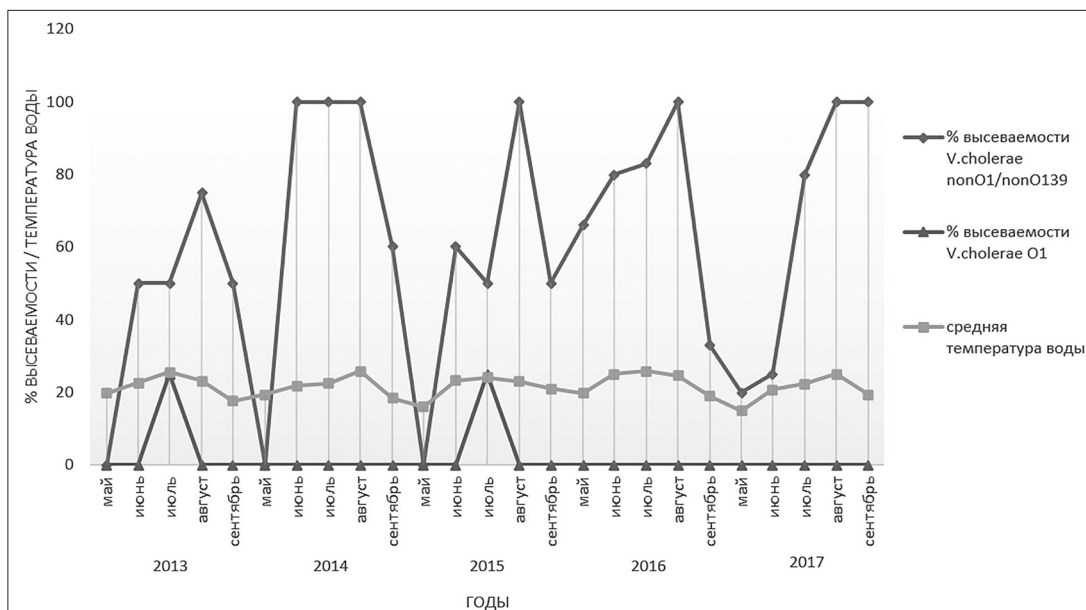


Рис. 1. Динамика выделения штаммов *V. cholerae* O1, nonO1/nonO139 в стационарной точке — р. Дн, правый берег, Державинский спуск с 2013 по 2017 гг.

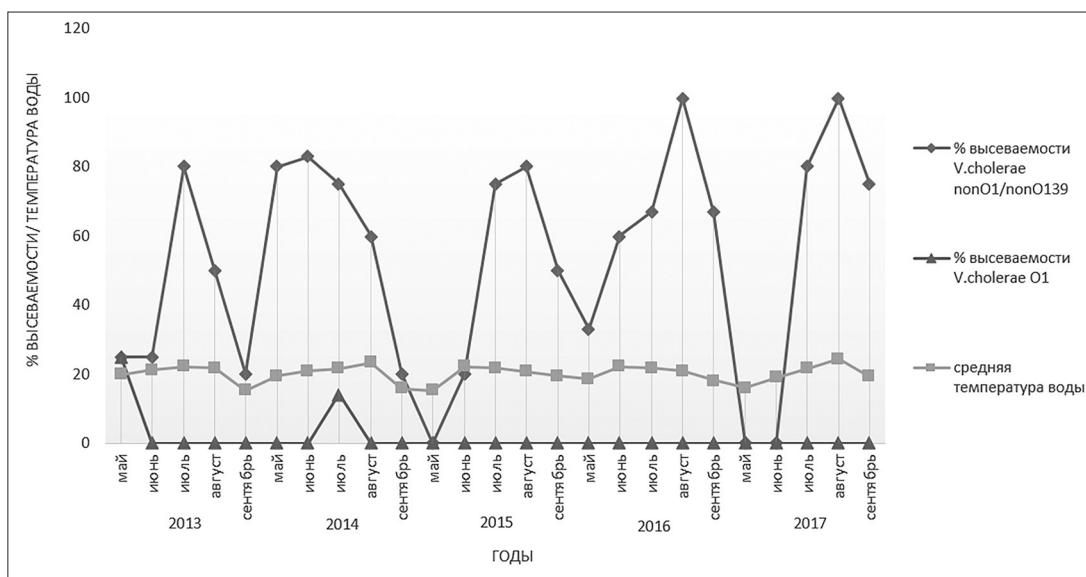


Рис. 2. Динамика выделения штаммов *V. cholerae* O1, nonO1/nonO139 в стационарной точке — р. Темерник, Ботанический сад, у моста с 2013 по 2017 гг.

Выделение холерных вибрионов O1 серогруппы различной токсигенности происходило в том же температурном диапазоне, что и холерных вибрионов nonO1/nonO139 серогрупп (от $19,8 \pm 0,9$ до $25,2 \pm 1,1$ °C).

На основании представленных данных был проведен корреляционный анализ между среднегодовым процентом высеваемости штаммов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 и средне-сезонной температурой воды за пятилетний период (табл. 4).

Таким образом, в результате проведенного корреляционного анализа была выявлена прямая средняя

связь между средне-сезонным процентом высеваемости штаммов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 и средне-сезонной температурой воды с 2013 по 2017 гг., что дает основание для предположения о том, что с увеличением температуры воды увеличивается процент высеваемости штаммов холерных вибрионов.

Необходимо также отметить, что самая высокая средне-сезонная температура воды была зафиксирована в 2016 году, чему соответствует наибольший процент высеваемости культур *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139.

Таблица 4

Расчет и оценка коэффициента корреляции между высеваемостью штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 и средне-сезонной температурой (Т °С) воды в стационарной точке – р. Дон, правый берег, Державинский спуск с 2013 по 2017 гг.

Годы	Средне-сезонный % высеваемости штаммов <i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139 (x)	Средне-сезонная Т °С воды (y)	Отклонение		dx ²	dy ²	dxdy
			dx	dy			
2013	40,9	21,7	-20,7	0,1	428,5	0,01	-2,1
2014	72,7	21,7	11,1	0,1	123,2	0,01	1,1
2015	52,0	21,5	-9,6	-0,1	92,2	0,01	1,0
2016	78,6	22,8	17,0	1,2	289,0	1,4	20,4
2017	63,6	20,5	2,0	-1,1	4,0	1,2	-2,2
n=5	Σx=307,8	Σy=108,2			Σdx ² =936,9	Σdy ² =2,6	Σdxdy=18,2
Средние	61,6	21,6					

Примечание: полученные значения подставляли в формулу расчета r (коэффициента корреляции): $r = \frac{\sum dxdy}{\sqrt{\sum dx^2 \sum dy^2}} = \frac{18,2}{\sqrt{936,9 \times 2,6}} = +0,4$. Связь прямая средняя

Таблица 5

Расчет и оценка коэффициента корреляции между высеваемостью штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 и среднемесячной температурой (Т °С) воды в стационарной точке – р. Дон, правый берег, Державинский спуск в 2017 г.

Месяцы	Среднемесячный % высеваемости штаммов <i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139 (x)	Среднемесячная Т °С воды (y)	Отклонение		dx ²	dy ²	dxdy
			dx	dy			
май	20,0	15,0	-45,0	-5,6	2025,0	31,4	252,0
июнь	25,0	20,8	-40,0	0,2	1600,0	0,04	-8,0
июль	80,0	22,8	15,0	2,2	225,0	4,8	33,0
август	100,0	25,0	35,0	4,4	1225,0	19,4	154,0
сентябрь	100,0	19,5	35,0	-1,1	1225,0	1,2	-38,5
n=5	Σx=325,0	Σy=103,1			Σdx ² =6300,0	Σdy ² =56,8	Σdxdy=392,5
Средние	65,0	20,6					

Примечание: полученные значения подставляли в формулу расчета r (коэффициента корреляции): $r = \frac{\sum dxdy}{\sqrt{\sum dx^2 \sum dy^2}} = \frac{392,5}{\sqrt{6300 \times 56,8}} = +0,66$. Связь прямая средняя

Исходя из указанных данных, представляет интерес проанализировать взаимосвязь между среднемесячным процентом высеваемости штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп и среднемесячной температурой воды на примере 2017 года (табл. 5).

На основании проведенного корреляционного анализа была выявлена прямая средняя связь между процентом высеваемости штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 и среднемесячной температурой воды в 2017 году, что дает нам основания предполагать, что с увеличением температуры воды увеличивается количество выделенных культур. Надо отметить, что наибольший процент культур *V. cholerae* nonO1/nonO139 высевался в диапазоне температур от 19,5 до 25,0 °С; исключение

составил июнь 2017 года в связи с нехарактерной погодой для Ростовской области (ливневые дожди).

Что касается стационарной точки отбора проб воды – р. Темерник, Ботанический сад у моста, то зафиксирована аналогичная взаимосвязь между процентом высеваемости штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп и температурой воды (рис. 2). Для уточнения установленной связи требуется продолжение исследований в данном направлении.

Заключение

Таким образом, в г. Ростове-на-Дону в реке Дон наблюдается тенденция к увеличению амплитуды колебаний средне-сезонной температуры, что, в свою очередь,

приводит к увеличению процентов высеваемости культур холерных вибрионов не O1/ не O139 серогрупп. Кроме того, нами отмечено обнаружение штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы, так же, как и *V. cholerae* nonO1/ nonO139, в температурном диапазоне от $19,8 \pm 0,9$ до $25,2 \pm 1,1$ °С.

На основании проведенного нами анализа можно предположить, что повышение температуры воды в реках г. Ростова-на-Дону может привести к накоплению холерных вибрионов в случае их заноса с эндемичных по холере территорий, что свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения влияния температурных флуктуаций воды поверхностных водоемов на циркуляцию холерных вибрионов для своевременного прогнозирования эпидемиологической обстановки по холере.

Литература

1. Глобальное потепление и его причины. [Электронный ресурс]: <http://www.worldclimate.ru/globalnoe-poteplenie-i-ego-prichiny/index.php>.
2. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Ежова М.И., Москвитина Э.А., Титова С.В. Анализ результатов мониторинга холерных вибрионов в объектах окружающей среды на административных территориях России с помощью ГИС «Холера 1989–2014» // Пробл. особо опасных инф. — 2017. — № 4. — С. 99–102.
3. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Ежова М.И. Анализ динамики выделения штаммов холерных вибрионов из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации с 1989 по 2016 гг. с помощью авторской ГИС // Вестник Пермского университета. — 2017. — № 1. — С. 112–117.
4. Методические разработки для учебных ординаторов медицинских институтов. Статистические методы в здравоохранении и медицине. — Ростов-на-Дону, 1978. — 109 с.
5. Методические указания МУК 4.2.2218-07: Лабораторная диагностика холеры: Методические указания. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. — 87 с.
6. Москвитина Э.А., Тюленева Е.Г., Кругликов В.Д., Титова С.В., Водопьянов А.С., Куриленко М.Л., Пакскина Н.Д., Иванова С.М., Анисимова Г.Б., Водопьянов С.О., Олейников И.П. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2008–2017 гг., прогноз на 2018 г. // Пробл. особо опасных инф. — 2018. — № 1. — С. 36–43.
7. Москвитина Э.А., Тюленева Е.Г., Самородова А.В., Кругликов В.Д., Титова С.В., Иванова С.М., Ковалева Т.В., Анисимова Г.Б. Эпидемиологическая обстановка по холере в мире и России в 2007–2016 гг., прогноз на 2017 г. // Пробл. особо опасных инф. — 2017. — № 1. — С. 13–20.
8. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Титова С.В., Адаменко О.Л., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии // Вестник РАМН. — 2015. — Т. 70. — № 2. — С. 249–256.
9. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Кутырев В.В., Смирнова Н.И., Щербак С.А., Москвитина Э.А., Титова С.В. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунол. — 2016. — № 1. — С. 89–101.
10. Панов В.Д., Лурье П.М., Ларионов Ю.А. Климат Ростовской области: вчера, сегодня, завтра. — Ростов-на-Дону, 2006. — 488 с.
11. СП 3.1.1.2521-09: Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации: Санитарные правила. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. — 35 с.
12. Титова С.В., Кругликов В.Д., Ежова М.И., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Водопьянов С.О., Москвитина Э.А. Анализ динамики выделения и биологических свойств штаммов *V. cholerae* O1 el-tor, изолированных из водных объектов на территории Ростовской области с 2003–2014 гг. // Здоровье населения и среда обитания. — 2015. — № 2(263). — С. 39–15.
13. de Magny G.C., Hasan Nur A., Roche B. How community ecology can improve our understanding of cholera dynamics // Front Microbiol. — 2014. — Vol. 5. — P. 137.
14. Escobar L., Ryan S.J., Stewart-Ibarra A.M., Finkelstein J.L., King C.A., Qiao H. A global map of suitability for coastal *Vibrio cholerae* under current and future climate conditions // Acta Trop. — 2015. — Vol. 149. — P. 202–211.
15. Jueterbock A., Tyberghein L., Verbruggen H., Coyer J.A., Olsen J.L., Hoarau G. Climate change impact on seaweed meadow distribution in the North Atlantic rocky intertidal // Ecol. Evol. — 2013. — Vol. 3(5). — P. 1356–1373.
16. Lipp E.K., Huq A., Colwell R.R. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model // Clin. Microbiol. Rev. — 2002. — Vol. 15(4). — P. 757–770.
17. Moore S.M., Azman A.S., Zaitchik B.F., Mintz E.D., Brunkard J., Legros D., Hill A., McKay H., Luquero F.J., Olson D., Lessler J. El Niño and the shifting geography of cholera in Africa // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2017. — Vol. 114(17). — P. 4436–4441.
18. Prusso C., Vezulli L., Colwell R.R. Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin // Environ. Microbiol. — 2008. — Vol. 10(6). — P. 1400–1410.

**INFLUENCE OF TEMPERATURE FLUCTUATIONS OF WATER
FROM SURFACE RESERVOIRS OF THE CITY OF ROSTOV-ON-DON
ON THE CIRCULATION OF *VIBRIO CHOLERAE***

Ye.A. MEN'SHIKOVA, I.V. ARKHANGEL'SKAYA, D.A. LEVCHENKO,
Ye.M. KURBATOVA, V.D. KRUGLIKOV, S.V. TITOVA

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

Temperature is one of the main factors affecting the frequency of detection and the number of vibrios. Geophysical studies conducted in the Rostov region note the climatic changes in the region, in particular the temperature increase in the spring-autumn period and the decrease in the amount of precipitation, which may have a beneficial effect on the development of pathogenic vibrioflora. In the Rostov-on-Don in surface water bodies there is a tendency to increase the amplitude of fluctuations in mean seasonal temperature, which, in turn, leads to an increase in the percentage of seeding of strains *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139. In addition, we observed the detection of strains of *Vibrio cholerae* O1, as well as *V. cholerae* nonO1/nonO139, in the temperature range from 19.8 ± 0.9 °C to 25.2 ± 1.1 °C.

Keywords: temperature, climatic changes, mid-season temperature, cholera vibrio.

УДК:616.932:611.018.54

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА НОВЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ФАГОВ И КОММЕРЧЕСКИХ ФАГОВЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ

Г.И. КОРОВКИНА, М.В. ОВЧИННИКОВА*, Н.Е. ГАЕВСКАЯ, О.С. ЗИНИНА

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

В целях совершенствования диагностики возбудителей холеры, главным образом, холерных вибрионов эльтор, проведена сравнительная оценка специфической активности экспериментальных бактериофагов, предоставленных ФКУЗ «Ростовский-на-Дону НИПЧИ» Роспотребнадзора, и коммерческого препарата «Бактериофаги диагностические холерные классический и эльтор, лиофилизат для диагностических целей» производства ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Ключевые слова: бактериофаги, литическая активность, фагоустойчивость, фагорезистентность, идентификация, эпидемические и неэпидемические штаммы.

Введение

Вопросам изучения биологии, экологии, геномики, применения бактериофагов в различных областях науки посвящены многие работы отечественных и зарубежных авторов. Бактериофаги благодаря своей высокой специфичности, технической доступности постановки анализа и экспрессности метода по-прежнему остаются востребованными в лабораторной диагностике холеры [1, 3, 8].

В последние годы выделяются штаммы, не обладающие чувствительностью к коммерческим диагностическим холерным бактериофагам, в частности, бактериофагам эльтор. Это, в свою очередь, указывает на снижение спектра литической активности бактериофага эльтор и затрудняет идентификацию холерных вибрионов в целом.

В то же время доказано, что штаммы, циркулирующие в очаге холеры в период эпидемий, находятся в типичной форме, но при спаде интенсивности эпидемического процесса от больных, носителей или из объектов внешней среды выделяются культуры со сниженной или утраченной вирулентностью. Наряду с авирулентными существуют слабовирулентные штаммы. Данные не-

которых исследований свидетельствуют о том, что эпидемическая значимость штаммов холерных вибрионов, выделенных на определенных неэпидемичных территориях по холере, не подтверждается чувствительностью к диагностическим холерным бактериофагам.

Механизм фагорезистентности культур холерных вибрионов к различным видам диагностических бактериофагов изучался многими отечественными исследователями [2, 4–7]. Было показано, что причинами фагоустойчивости могут быть либо изменчивость штаммов холерных вибрионов эльтор под влиянием антропогенных и экологических факторов, приводящая к вариабельности поверхностных структур, в результате которой адсорбция фага на бактериальной клетке становится невозможной, либо нарушение репродукции фага внутри клетки, в основе которого лежит изменение клеточных ферментативных систем, осуществляющих синтез фагового генома, а также контролирующих его специфичность [2]. Кроме этого, одной из главных причин снижения или потери чувствительности к диагностическим фагам может являться носительство гомоиммунных умеренных фагов клетками исследуемых штаммов [5].

В связи с изложенным проблема совершенствования фагодиагностики холерных вибрионов биовара эльтор остается по-прежнему обоснованной и актуальной.

В ФКУЗ «Ростовский-на-Дону НИПЧИ» Роспотребнадзора были разработаны экспериментальные диагностические холерные бактериофаги для идентификации холерных вибрионов O1 классического и эльтор биоваров жидкие (O1, Cl, El 1, El 2). В 2016 году в

© 2018 г. Коровкина Г.И., Овчинникова М.В., Гаевская Н.Е., Зинина О.С.

* Автор для переписки:

Овчинникова Мария Владимировна

к.б.н., зав. лабораторией диагностических препаратов ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора»

E-mail: begemot2006@list.ru

ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора были проведены совместные межучрежденческие комисионные испытания по сравнительной оценке спектра литической активности вышеуказанных экспериментальных бактериофагов и коммерческого препарата «Бактериофаги диагностические холерные классический и эльтор, лиофилизат для диагностических целей» производства ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. В опыт были взяты образцы трех серий экспериментальных и коммерческих препаратов.

Материалы и методы

Испытания были проведены с использованием 112 штаммов *V. cholerae* O1, предоставленных Государственной коллекцией патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» (ГКПБ «Микроб»): 19 штаммов классического и 93 штамма эльтор биоваров. 57 штаммов выделены из объектов внешней среды (вода), 35 штаммов — от больных людей, 6 штаммов — из материала трупов, у 14 штаммов место выделения неизвестно. Все штаммы выделены в период с 1942 по 2015 гг., из них 30% штаммов с 1942 по 1998 гг., остальные — с 1998 по 2015 гг. Место выделения — преимущественно на территории Российской Федерации (104 штамма), а также из очагов холеры на территории Индии, Пакистана, Афганистана, Вьетнама (8 штаммов). Критериями выбора штаммов являлись показатели чувствительности (лизируются до ДРТ) и устойчивости (не лизируются или лизируются в титрах ниже ДРТ) к бактериофагу диагностическому холерному эльтор, чувствительность к классическому бактериофагу.

Определение спектра литической активности проводили методом агаровых слоев по Грациа. Подготовка бактериофагов осуществлялась следующим образом: ампулы с бактериофагами холерными классическим и эльтор предварительно растворяли в 1 мл дистиллированной воды. Готовили последовательные десятикратные разведения фагов от 10^{-1} до ДРТ: бактериофаг холерный классический ДРТ — 10^{-2} , бактериофаг холерный эльтор ДРТ — 10^{-3} . Экспериментальные диагностические холерные бактериофаги для идентификации холерных вибрионов O1 классического и эльтор биоваров жидкие (O1, Cl, El 1, El 2) использовали в цельном виде.

Оценку литической активности фагов проводили по 4-балльной системе. За положительный результат принимали любую степень лизиса.

В ходе испытаний экспериментальных бактериофагов диагностических холерных для идентификации холерных вибрионов O1 классического и эльтор биоваров

жидкие (O1, Cl, El 1, El 2), разработанных в ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, установлено, что:

- 1) из 93 штаммов *V. cholerae* eltor:
 - 34 штамма идентифицированы как *V. cholerae* eltor (36,5%),
 - 40 штаммов идентифицированы как *V. cholerae* O1 (43%),
 - 2 штамма идентифицированы как *V. cholerae cholerae* (2,1%),
 - 12 штаммов резистентны к испытываемым экспериментальным бактериофагам O1, Cl, El 1, El 2 (12,9%),
 - 5 штаммов чувствительны к испытываемым экспериментальным бактериофагам Cl, El 1, El 2 (5,4%);
- 2) из 19 штаммов *V. cholerae cholerae*:
 - 11 штаммов идентифицированы как *V. cholerae cholerae* (58%),
 - 7 штаммов идентифицированы как *V. cholerae* O1 (37%),
 - 1 штамм чувствителен к испытываемым экспериментальным бактериофагам O1, Cl, El 2.

«Бактериофаги диагностические холерные классический и эльтор, лиофилизат для диагностических целей» (ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора), используемые в качестве образца сравнения, показали следующий уровень специфической активности:

- классический бактериофаг лизировал 89% штаммов *V. cholerae cholerae* (17 из 19),
- эльтор бактериофаг — 45% штаммов *V. cholerae* eltor (42 из 93).

В ходе исследования наблюдалась различная степень лизиса чувствительных штаммов: от полного лизиса клеток до образования единичных негативных колоний на месте нанесения бактериофагов.

Полученные результаты свидетельствовали о диагностической ценности коммерческого диагностического классического бактериофага, а специфическая активность испытанных образцов экспериментальных бактериофагов эльтор, в сравнении с коммерческим препаратом эльтор, находилась на сопоставимом уровне. В связи с этим особый интерес дальнейших исследований представляло изучение спектра литической активности фаговых комбинаций, состоящих из экспериментальных бактериофагов El 1, El 2 и монофагов, входящих в состав коммерческого препарата

бактериофага эльтор. Например: смеси из монофагов E1 1, E1 2 и бактериофаг эльтор, различные сочетания монофагов E1 1, E1 2 с отдельными монофагами, входящими в состав эльтор бактериофага.

Во всех вариантах фаги E1 1, E1 2, XII и XV использовались в цельном виде, коммерческий препарат эльтор в ДРТ 10^{-2} , смеси составлялись в соотношении 1:1.

Опыт проводился методом Грация на штаммах, указанных выше, но выборочно, и разделенных на три

группы по признаку лизабельности: 1-я группа — 8 штаммов не лизировались фагами E1 1, E1 2 и коммерческим препаратом эльтор; 2-я группа — 8 штаммов лизировались фагами E1 1, E1 2 и не лизировались коммерческим препаратом эльтор; 3-я группа из 10 штаммов не лизировались фагами E1 1, E1 2, но лизировались эльтор, а также в эксперимент были взяты контрольные штаммы для производства бактериофага коммерческого эльтор. Результаты эксперимента представлены в таблице 1.

Таблица 1

Спектр литической активности фаговых комбинаций, состоящих из экспериментальных бактериофагов E1 1, E1 2 и монофагов, входящих в состав коммерческого препарата бактериофага эльтор

<i>V. eltor</i>	E1 1	E1 2	эльтор	смесь 1:1	E1 1 +XII	E1 1 +XV	E1 2 +XII	E1 2 +XV	E1 1 + E1 2 +XII	E1 1 + E1 2 +XV	E1 1 + эльтор	E1 2 + эльтор
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
I группа												
M 1474 2010 г	-	-	-	-	2	2	2	-	2	-	-	-
8 2014 г	-	-	-	-	2–3	2–3	1	-	1	-	-	-
57 2014 г	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-1242 1989 г	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-1333 2000 г	-	-	-	-	2	2	1	-	+-	+-	-	-
M-1338 2000 г	-	-	-	-	-	+-	-	-	-	-	-	-
M-1269 1994 г	-	-	-	-	+-	2–3	+-	+-	+-	-	-	-
M-1429 2004 г	-	-	4	-	-	4	-	2	-	2	-	-
%	0	0	12,5	0	37,5	62,5	37,5	12,5	25	12,5	0	0
II группа												
29 2015 г	-	3	-	3	-	2	3	3	3	3	-	3
40 2015 г	+-	-	-	+-	1–2	1–2	-	-	-	+-	+-	-
1531	-	-	-	-	+-	+-	+-	-	-	-	-	-
M-1427 2003 г	-	+-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
M-1428 2003 г	-	+-	-	+-	-	+-	+-	+-	+-	+-	-	-
M-1438 2007 г	+-	1–2	-	1–2	-	-	2	2	1	2	-	1
M-1417 2002 г	+-	-	+-	-	-	3	-	4	-	4	+-	-
M-1521 2014 г	-	-	4	-	-	4	-	4	2	2	3	4
%	0	25	12,5	25	12,5	62,5	25	50	37,5	50	12,5	37,5
III группа												
M-1355 2001 г	1	-	4	4	4	4	3	4	3	3	3	4
M-1461 2010 г	-	-	3	3	3	3	3	4	3	3	2–3	4

<i>V. eltor</i>	El 1	El 2	эльтор	смесь 1:1	El 1 +XII	El 1 +XV	El 2 +XII	El 2 +XV	El 1 + El 2 +XII	El 1 + El 2 +XV	El 1 + эльтор	El 2 + эльтор
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
М-1462 2010 г	+ -	-	3	3	3	4	2-3	4	3	2-3	2	4
М-1506 2011 г	-	-	3	-	3	1-2	+ -	+ -	2-3	-	-	-
М-1509 2012 г	-	-	2-3	2-3	2-3	2-3	3	3	4	3	3	3
М-1463 2010 г	-	-	4	4	4	4	4	3	4	3	3	3
Р-18810 2005 г	-	3	4	4	3	4	2	2	+ -	2-3	2	2
Р-18775 2005 г	-	-	3	-	2-3	1-2	3	-	3	-	3	3
М-1353 2001 г	+ -	-	4	3	3	4	3	4	3	3	3	3
Р-18798 2005 г	-	-	-	-	+	+	3	-	3	-	2-3	2
%	10	10	90	70	90	90	90	70	90	70	90	90
Контрольные штаммы для эльтор (коммерческий препарат)												
231	-	-	3	4	4	-	4	-	2-3	-	4	2
119	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4
84 p	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
126	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
109	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4
276	4	4	4	4	4	4	2	3	3	3	3	3
2004	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
321	1	-	3	4	4	2	2	-	2-3	+ -	2-3	3
411 тб	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
407 тб	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4
%	90	80	100	100	100	90	100	80	100	85	100	100

Условная выборка штаммов по принципу лизабельности еще раз подтвердила узкий спектр литической активности экспериментальных фагов — во всех группах штаммов процент спектра литической активности не превышал 25%.

Комплексный анализ полученных результатов показал, что в двух первых группах штаммов смесь, состоящая из фагов El 1 и XV, показала наилучший результат спектра литического действия, что в процентном отношении составило 62,5%. Было высказано предположение, что данный результат обусловлен присутствием в смеси монофага XV в цельном виде, что позволило повысить лизирующее действие экспериментальной смеси в отношении абсолютно фаго-резистентных штаммов.

В третьей группе штаммов высокий процент спектра литического действия был обусловлен вариантами смесей с монофагами коммерческого бактериофага эльтор.

Для подтверждения данного предположения в следующем опыте сравнивали непосредственно литическую активность смесей, состоящих из сочетания El 1, El 2 с отдельными монофагами, с конкретными монофагами (XII и XV), входящими в бактериофаг эльтор, и экспериментальными бактериофагами El 1, El 2 на произвольно взятых семи эпидемически опасных и восьми эпидемически неопасных штаммах, не входящих в предыдущие эксперименты.

Результаты и обсуждение

Наше предположение о роли увеличения литической активности смесей с монофагами коммерческого препарата эльтор подтвердилось тем, что процент чувствительных эпидемически опасных штаммов к экспериментальным бактериофагам El 1, El 2 составил от 14 до 28,5%, к смесям El 1, El 2 с отдельными монофагами XII и XV — от 86 до 100%, к монофагу XV — 100% (табл. 2).

Чувствительность изучаемых фаговых вариантов к эпидемическим и неэпидемическим штаммам

<i>V. eltor</i>	EI 1	EI 2	эльтор	XII	XV	EI 1 + XII	EI 1 + XV	EI 2 + XII	EI 2 + XV
	ц	ц	10 ⁻²	ц	ц	1:1	1:1	1:1	1:1
	ц	ц	10 ⁻²	ц	ц	ц	ц	ц	ц
Эпидемические штаммы									
16	-	-	4	3	4	4	4	4	4
32	+-	-	4	2	4	2	4	1	4
51	-	-	4	2	4	4	4	4	4
123	-	-	3	2	4	2	4	2	4
669	-	-	2	-	4	-	4	-	4
4368	4	4	4	4	4	4	4	4	4
407	-	4	4	4	4	4	4	4	4
%	14	28,5	100	86	100	86	100	86	100
Неэпидемические штаммы									
570	-	-	-	-	2	-	-	-	3
1102	-	-	-	2	2	2	2	2	2
774	-	-	-	-	1	-	-	-	-
682	4	4	4	-	4	4	4	4	4
1104	-	-	-	3	3	3	3	3	3
М-1329	4	4	4	-	4	4	4	4	4
М-1330	4	4	4	-	4	4	4	4	4
1124	-	-	-	2	2	2	+-	2	2
%	37,5	37,5	37,5	37,5	100	75	62,5	75	87,5

Процент чувствительных эпидемически неопасных штаммов к экспериментальным бактериофагам EI 1, EI 2 составил 37,5%, к смесям EI 1, EI 2 с отдельными монофагами XII и XV – от 75 до 87,5%, к монофагу XV – 100%.

Заключение

Суммируя все результаты, можно сделать вывод, что ни коммерческий препарат эльтор производства РосНИП-Чи «Микроб», ни экспериментальные бактериофаги, разработанные РостНИЧПИ, не обладают 100% литической активностью в отношении холерных вибрионов биовара эльтор. Таким образом, полученные опытные данные послужат основой дальнейшего поиска высокоэффективных фагов и разработки на их основе бактериофаговых препаратов для совершенствования диагностики холеры.

Литература

1. Камтер Э., Сулаквелидзе А. Бактериофаги: биология и практическое применение / Пер. с англ.: коллектив пер.; науч. ред. рус. изд. А.В. Летаров. – М.: Науч. мир, 2012. – 636 с.
2. Кудрякова Т.А., Черепахина И.Я., Алексеева Л.П. и др. Причины устойчивости холерных вибрионов к диагностическим фагам // Микробиол. журн. – 1995. – Т. 57. – № 3. – С. 56–64.
3. Ломов Ю.М., Сомова А.Г., Кудрякова Т.А. Холерные фаги. – Ростов-на-Дону, 1990. – 159 с.
4. Овчинникова М.М., Аленкина Т.В., Коровкина Г.И., Грачева И.В. Изучение некоторых причин фагорезистентности эпидемически неопасных штаммов *V. cholerae eltor* к бактериофагу диагностическому холерному *ctx* / В кн.: Холера и патогенные для человека вибрионы. Материалы проблемной комиссии. – Ростов-на-Дону, 2010; – 23. – С. 62–66.
5. Овчинникова М.М., Коровкина Г.И., Грачева И.В., Аленкина Т.В. Лизогенная система неэпидемических холерных вибрионов биовара эльтор, резистентных к диагностическому бактериофагу *ctx* / Проблемы особо опасных инфекций. – 2012. – № 2(112). – С. 43–45.
6. Остроумова Н.М., Коровкина Г.И., Синичкина Н.А. Некоторые причины резистентности вирулентных *vst* штаммов холерных вибрионов биовара эльтор к диагностическим фагам ХДФ-3,4,5 и пути усовершенствования фагодиагностики // Scient. J. – 1999. – No. 7. – P. 257–259.
7. Labrie S.J., Samson J., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms // Nat. Rev. Microbiol. – 2010. – Vol. 8(5). – P. 317–327.
8. Tock M.R., Dryden D.T. The biology of restriction and anti-restriction // Curr. Opin. Microbiol. – 2005. – Vol. 8(4). – P. 466–472.

COMPARATIVE ASSESSMENT OF NEW EXPERIMENTAL PHAGES AND COMMERCIAL PHAGE PREPARATIONS FOR CHOLERA DIAGNOSTICS

G.I. KOROVKINA, M.V. OVCHINNIKOVA, N.E. GAEVSKAYA, O.S. ZININA

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

In order to improve the diagnostics of cholera agents, mainly cholera vibrios biovar El Tor, comparative assessment of non-specific activity of experimental bacteriophages provided by Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute and commercial preparation «Cholera Bacteriophages, diagnostic, classical and El Tor, lyophilizate for diagnostic purposes» manufactured at Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» has been carried out.

Keywords: bacteriophages, lytic activity, phage-resistance, identification, epidemic and non-epidemic strains.

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА ПРЯМОГО ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО ГЕМОЛИЗИНА (ТДН) *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

М.В. ПОЛЕЕВА*, О.С. ЧЕМИСОВА, Р.В. ПИСАНОВ, О.А. ЦЫРУЛИНА

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

Предложен способ получения и очистки препарата термостабильного прямого ТДН-гемолизина *V. parahaemolyticus*, показана высокая степень очистки препарата. Методом MALDI-ToF масс-спектрометрии выявлены специфические масс-пики, соответствующие препарату ТДН-гемолизина *V. parahaemolyticus*.

Ключевые слова: *V. parahaemolyticus*, термостабильный прямой ТДН-гемолизин, FPLC хроматография, MALDI-ToF-масс-спектрометрия.

Введение

Vibrio parahaemolyticus: грамотрицательная галофильная бактерия, встречающаяся в природе в морских и эстуарных водах и часто изолируемая из различных морепродуктов, — устрицы, креветки, крабы, лобстеры, омары, раки, рыба (треска, сардина, скумбрия, камбала), осьминоги, гребешки — и замороженных морепродуктов во многих странах мира [8, 11, 19]. Этот возбудитель вызывает заболевание по типу острого гастроэнтерита, характеризующегося тошнотой, рвотой, спазмами в животе, диареей [6, 7]. В особо тяжелых случаях инфицирование может приводить к распространению заболевания и вызывать сепсис. Бактерии *V. parahaemolyticus* также могут вызывать поражение кожи, заболевания ушей, раневые инфекции [4, 14, 20]. Поэтому для практического здравоохранения важно быстро и достоверно определить как наличие возбудителя в исследуемом материале, так и его вирулентность.

Основным фактором патогенности парегемолитических вибрионов представляется термостабильный прямой гемолизин (ТДН — thermostable direct hemolysin) [15]. ТДН проявляет широкий спектр биологической активности: гемолитичность (вызывает лизис эритроцитов человека, барана, кур, телят, мышей и кроликов), цитотоксичность в отношении различных типов клеток

(FL-клетки — клетки амниотической мембраны человека, Int407 — human embryonic cell line) [10, 18]. ТДН обладает способностью замедлять скорость клеточного цикла — способствует значительному замедлению вхождения клеток в фазу G2/M [9]. ТДН действует как порин в мембране энтероцитов, обуславливая приток нескольких видов ионов (кальция, натрия, марганца, хлоридов) [17]. При незначительной концентрации гемолизина и соответственно низком числе ТДН-производных пориновых каналов клетка благодаря компенсаторным механизмам остается жизнеспособной. В случае высокой концентрации ТДН число каналов и приток ионов резко возрастают, нарушается ионный баланс, наступает гибель клетки [21]. Установлено, что большинство клинических штаммов *V. parahaemolyticus*, в отличие от выделенных из окружающей среды, способно к продукции ТДН [16].

Традиционными и основными на сегодняшний день методами идентификации *V. parahaemolyticus* являются бактериологические методы. Определение способности парегемолитических вибрионов к продукции ТДН проводят методом Канагава. Метод основан на способности парегемолитических вибрионов продуцировать прямой термостабильный гемолизин на среде Вагатцума, образуя зону гемолиза. По результатам тестирования штаммы делят на Канагава-положительные, образующие зону гемолиза, и Канагава-отрицательные, не лизирующие эритроциты человека [2]. За рубежом для достоверной оценки продукции ТДН применяют серологические методы, использование которых обеспечено коммерческими препаратами. Для детекции ТДН разработаны тест-системы для латекс-агглютинации (КАР-RPLA; Denka Seiken Co., Ltd., Токуо, Japan), иммуноферментного анализа (ELISAs). В нашей стране подобных препаратов нет. Для разработки диагностических препаратов

© 2018 г. Полеева М.В., Чемисова О.С., Писанов Р.В., Цырулина О.А.

* **Автор для переписки:**

Полеева Марина Владимировна

научный сотрудник музея живых культур с центром патогенных для человека вибрионов, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора»

E-mail: marina-akulova@mail.ru

требуется получение очищенного и высокоактивного препарата токсина. В связи с этим необходимы исследования, направленные на подбор штаммов-продуцентов ТДН, оптимальных условий его продукции и получение препарата ТДН.

Ранее нами путем селекции штамма *V. parahemolyticus* 958 был получен клон *V. parahemolyticus* P-14810/1 (серогруппа O4:K12), обладающий высокой гемолитической и цитотоксической активностью в отношении культур клеток позвоночных L-929, Нер-2 и McCoу, а также характеризующийся стабильностью этих признаков, что проверено в течение многократных пассажей [3]. Данный штамм-продуцент ТДН депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора под номером КМ-2027 и может быть использован для получения и изучения функциональных особенностей термостабильного прямого гемолизина *V. parahemolyticus*.

Целью настоящей работы явились выделение термостабильного прямого гемолизина парагемолитических вибрионов из штамма-продуцента *V. parahemolyticus* КМ 2027, а также получение характеристик чистоты и стабильности препарата различными методами, в том числе и методом MALDI-ToF масс-спектрометрии.

Материалы и методы

Штаммы. Для продукции токсина использовали штамм-продуцент *V. parahemolyticus* 14810/1 (КМ 2027) из коллекции Музея живых культур с центром патогенных вибрионов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора».

Методы культивирования. Штамм культивировали при 37 °С в бульоне Вагатацума с дополнительной аэрацией (шуттелированием). Культуру, выращенную в питательной жидкой среде, центрифугировали при 10000 об/мин 20 минут на холоду. Культуральную жидкость обеззараживали добавлением мертиолята натрия.

Выделение и очистка препарата ТДН-токсина. Выделение и очистку препарата проводили методом хроматографии в обращенной фазе на FPLC Byologic Pathfinder Duoflow, используя колонки с матрицей Butyl Toyoraerl 650M и UNO-Q6 Bio-Rad.

Методика постановки реакции гемолиза в планшетах. Гемолитическую активность определяли в 96-луночных круглодонных планшетах, используя 5% взвесь эритроцитов. Планшеты инкубировали при температуре 37 °С. Учет результатов проводили через 2 часа.

Электрофорез белков. Электрофорез на наличие белков проводили в присутствии SDS по методике U.K. Laemmli (1970) [13]. Для разделения белков применяли 10% полиакриламидный гель с 0,1% SDS. Буфер для приготовления образцов включал в себя 0,125 моль трис-НСl (рН 6,8), 4% SDS, 20% глицерина, 2% 2-меркаптоэтанола, 0,03 ммоль бромфенолового синего. Полученный препарат ТДН смешивали с буфером 1:1, кипятили на водяной бане в течение 5–7 мин. Электрофорез проводили до вхождения образца в разделяющий гель при нагрузке тока 10 мА и далее при 20 мА. Электродный буфер (рН 8,3) содержал: 0,192 моль глицина; 0,025 ммоль трис; 0,1% SDS. Белки фиксировали в течение ночи в растворе изопропанола, окрашивали в 0,1%-ном растворе кумасси R-250 и отмывали в 7%-ном растворе уксусной кислоты.

Анализ препарата термостабильного прямого гемолизина (ТДН) *V. parahemolyticus* методом MALDI-ToF масс-спектрометрии. Масс-спектрометрию проводили на масс-спектрометре Autoflex speed III Bruker Daltonics (Германия). В качестве матрицы использовали α -циано-гидроксикоричную кислоту.

1. Готовили 5%-ный раствор трифторуксусной кислоты (950 мкл высокоочищенной воды для масс-спектрометрии + 50 мкл чистой трифторуксусной кислоты). Полученный раствор перемешивали. Затем к 500 мкл 5%-ного раствора трифторуксусной кислоты добавляли 500 мкл чистого ацетонитрила. Получившуюся смесь растворителей (OS) использовали для приготовления матрицы. При необходимости OS можно хранить при комнатной температуре (+22 – +25 °С) несколько недель.

2. 2,5 мг α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (HCCA) смешивали с 250 мкл OS. Перемешивали несколько минут на вортексе при комнатной температуре (+22 – +25 °С) до полного растворения. Готовую матрицу можно хранить при комнатной температуре несколько недель.

Снятие белковых спектров проводили в программе Flex Control в диапазоне 2000–20000 m/z, а их обработку в программе Flex Analysis.

Результаты и обсуждение

Выделение и очистка препарата ТДН-токсина. К обеззараженной культуральной жидкости добавляли сульфат аммония (СА) до концентрации 150 мМ и Трис-НСl рН – 7,0 до 50 мМ. Очистку токсина проводили на FPLC Pathfinder Duoflow Bio-Rad. Культуральную

жидкость после осаждения наносили на колонку с матрицей для ХОФ (хроматография в обращенной фазе) Butyl Toyopaerl 650M. Промывали буфером 150 мМ СА и 50 мМ Трис-НСl рН – 7,0. Токсин элюировали снижающимся градиентом СА от 150 до 0 мМ. В результате получили 31 фракцию (рис. 1), гемолитическую активность которых проверили методом гемоллиза в планшете с человеческими эритроцитами.

Гемолиз эритроцитов вызывали 8 фракций, полученных на 65–75 минутах элюирования. Эти фракции объединяли и наносили на ионообменную колонку UNO-Q6 Bio-Rad. уравновешенную 50 мМ Трис-НСl рН – 7,0, токсин элюировали повышающимся градиентом хлорида калия от 0 до 1 М. Профиль элюции на анионообменной колонке при заданных условиях имел 3 пика (рис. 2).

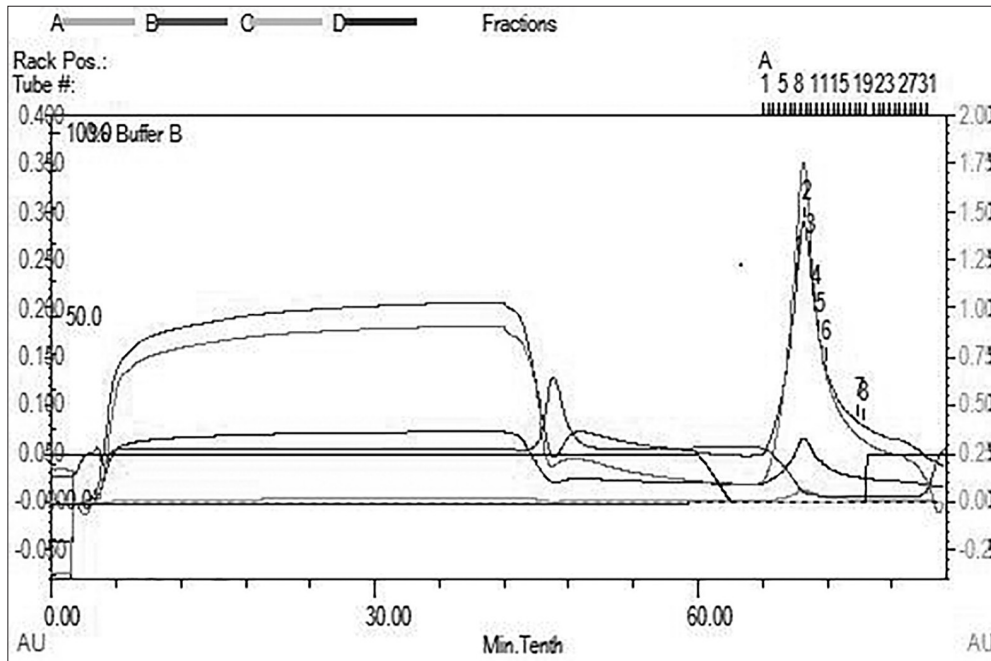


Рис. 1. Профиль элюции культуральной жидкости штамма *V. parahaemolyticus* KM-2027 на колонке Butyl Toyopaerl 650M

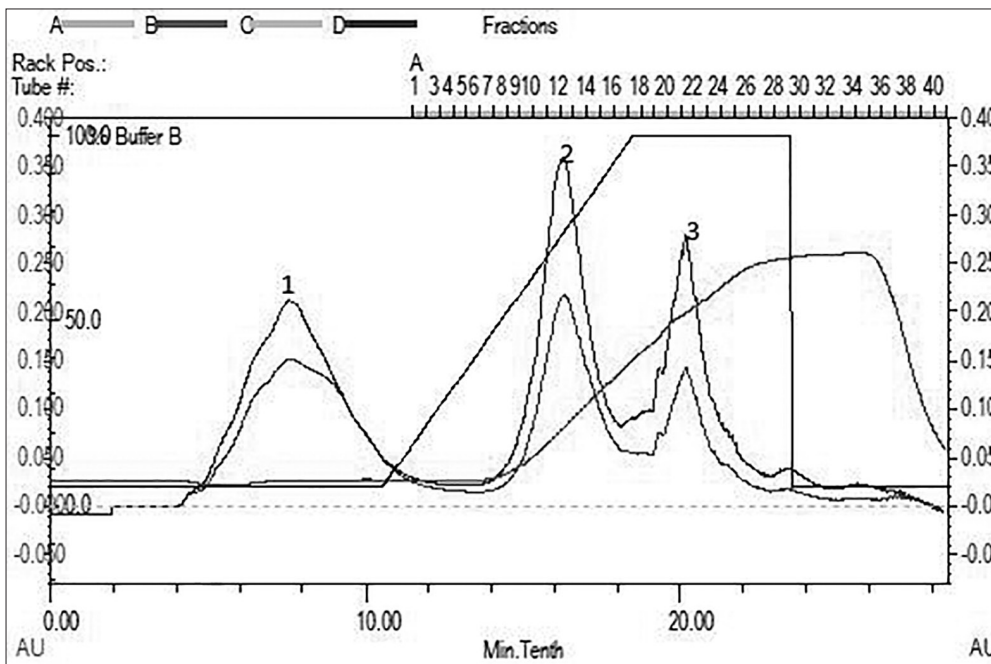


Рис. 2. Профиль элюции суммарного препарата гемолитиз-позитивных фракций на колонке UNO-Q6

Пик 1, появившийся в уравнивающей 50 мМ Трис-НСI буфере при рН — 7,0, представляет собой белковые молекулы, не связавшиеся с носителем («проскок»). Пики 2 и 3 элюировались после увеличения молярности. Гемолизин содержался во втором пике, что подтверждалось положительным результатом в реакции гемолиза с человеческими эритроцитами. Фракции второго пика объединяли и диализовали против 0,9%-ного раствора хлорида натрия, измеряли количество белка по Лоури. В среднем выход очищенного гемолизина от общего количества белка в исходном препарате составлял 0,3%.

При получении препаратов бактериальных токсинов немаловажным фактором является качество бактериальных антигенов (степень очистки от балластных белков, концентрация, стабильность). Единого подхода при характеристике полученных антигенов не существует, выбор методов анализа зависит от химических и физико-химических параметров, структурных особенностей молекулы. Для характеристики белковых антигенов могут быть использованы, например, электрофорез в полиакриламидном геле, капиллярный электрофорез, изоэлектрическое фокусирование, высокоэффективная жидкостная хроматография, пептидное картирование, в том числе в сочетании с масс-спектрометрией и др. [5].

Для проверки степени очистки полученного препарата ТДН использовали такие методы, как белковый электрофорез и анализ препарата ТДН методом MALDI-ToF масс-спектрометрии.

Электрофорез белков. Электрофорез на наличие белков проводили в присутствии SDS по методике U.K. Laemmli (1970) [13]. Электрофорез полученного препарата представлен на рисунке 3.

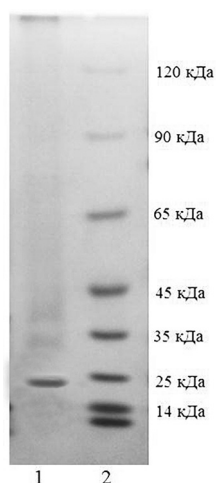


Рис. 3. Электрофорез в полиакриламидном геле с SDS препарата ТДН (1), маркеры молекулярных масс (2)

Для очищенного препарата характерно наличие одной мажорной белковой полосы на уровне маркера молекулярной массы 23 кДа, что соответствует литературным данным, согласно которым молекулярная масса ТДН составляет 23 кДа [12].

Анализ препарата термостабильного прямого гемолизина (ТДН) *V. parahaemolyticus* методом MALDI-ToF масс-спектрометрии. Для изучения и анализа препарата термостабильного прямого гемолизина (ТДН) *V. parahaemolyticus* использовали метод MALDI-ToF масс-спектрометрии с использованием масс-спектрометра Autoflex speed III Bruker Daltonics (Германия) с программным обеспечением Biotyper.

Характер масс-спектров сильно зависит от многих параметров: природы матрицы, количественного соотношения матрица:образец, длины волны, длительности импульса и мощности лазерного излучения. Поэтому анализ каждого типа соединений требует оптимального подбора многих этих параметров [1]. Для успешного проведения анализа необходимо правильно выбрать растворитель, матрицу и соотношение между матрицей и анализируемым веществом.

Нами были изучены различные соотношения матрица:образец — 1:1, 1:5, 1:10. Было установлено, что оптимальным является соотношение 1:10. Дальнейшие исследования препарата токсина проводили, используя именно это соотношение. Препарат токсина и матрицу смешивали в эппендорфе в соотношении 1:10 и наносили на мишень для MALDI 1 мкл смеси. После нанесения пробы высушивали на воздухе.

При масс-спектрометрии полученного препарата ТДН *V. parahaemolyticus* были выявлены масс-пики с m/z 2452±5, 4911±7, 4946±5 (рис. 4). Поскольку полученный препарат характеризуется высокой степенью очистки, что доказывается проведением белкового электрофореза, можно предположить, что данные пики соответствуют препарату ТДН.

Также в ходе выполнения работы мы провели оценку стабильности препарата ТДН методом масс-спектрометрического анализа в процессе хранения при $t=-8$ °С, $t=+4$ °С. Было установлено, что хранение препарата в замороженном виде приводит к отсутствию пиков, характерных для препарата ТДН (рис. 4, зеленый масс-лист). Отсутствие активности препарата подтверждалось также отсутствием гемолитической активности при постановке реакции в планшете. Вышеизложенное позволяет использовать метод MALDI-TOF масс-спектрометрии при определении стабильности полученного препарата в процессе хранения.

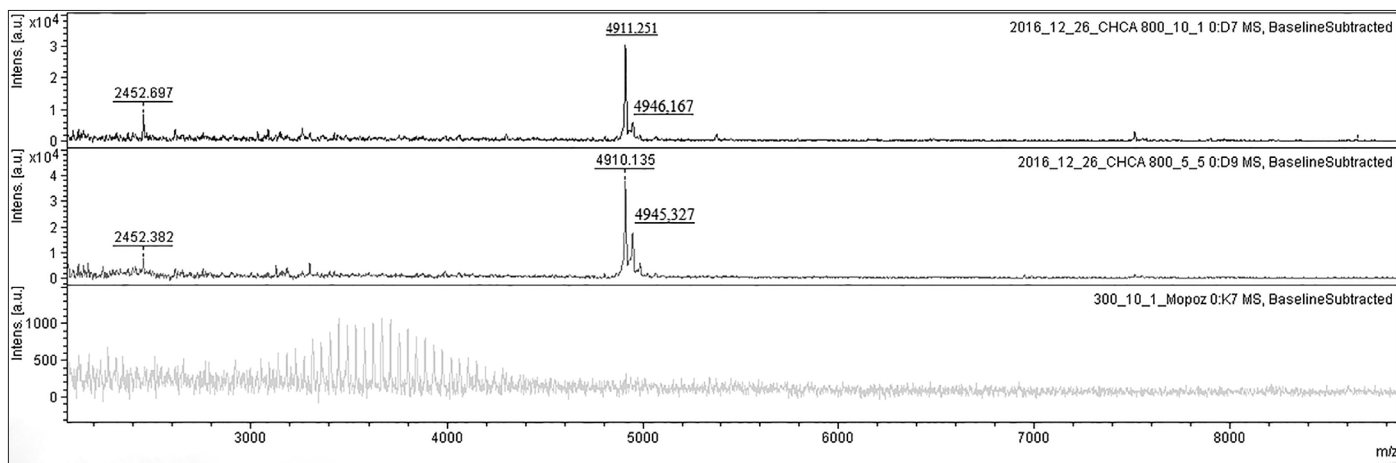


Рис. 4. MALDI-TOF масс-спектры, характерные для препарата токсина TDH (синий — верхняя кривая, красный — средняя кривая — препарат токсина — пики 2452 ± 5 , 4911 ± 7 , 4946 ± 5 ; зеленый — нижняя кривая — масс-лист — отсутствие пиков после замораживания препарата)

Заключение

Таким образом, нами был разработан метод получения препарата прямого термостабильного гемолизина *V. parahaemolyticus* и методами молекулярной биологии доказана его высокая степень очистки, что позволит в дальнейшем использовать полученный препарат для решения вопросов научно-исследовательского характера, изучения функциональных особенностей токсина, разработки диагностических препаратов.

Литература

1. Лебедев А.Т., Заикин В.Г. Задачи и достижения современной масс-спектрометрии // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. — 2007. — Т. 73. — № 2. — С. 21–30.
2. МУК 4.2.1793–03. Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых паразитическими и другими патогенными для человека вибрионами: Методические указания. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2003. — 39 с.
3. Рыковская О.А., Чемисова О.С., Полеева М., Самаянц Е.М. Поиск штамма-продуцента термостабильного прямого гемолизина (TDH) *Vibrio parahaemolyticus* // Холера и патогенные для человека вибрионы: Сб. статей пробл. комиссии. — Ростов-на-Дону, 2016. — Вып. 29. — С. 202–205.
4. Смоликова Л.М., Ломов Ю.М., Хоменко Т.В. и др. Галофильные вибрионы, обусловившие вспышку пищевой токсикоинфекции во Владивостоке // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 2001. — № 6. — С. 3–7.
5. Чемисова О.С., Полеева М.В., Рыковская О.А., Писанов Р.В. Характеристика бактериальных антигенов белковой природы с помощью MALDI-ToF масс-спектрометрии //

Инфекционные болезни. — 2017. — Т. 15. — Приложение 1. Матер. IX ежегод. Всерос. конгресса по инф. болезням с международ. участием. — С. 307.

6. Chakraborty S., Nair G.B., Shinoda S. Pathogenic vibrios in the natural aquatic environment // Rev. Environ. Health. — 1997. — Vol. 12(2). — P. 63–80.
7. Daniels N.A., Ray B., Easton A. et al. Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: A prevention quandary // J. Am. Med. Assoc. — 2000. — Vol. 284(12). — P. 1541–1545.
8. Deepanjali A., Kumar H. S., Karunasagar I., et al. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oyster along the southwest coast of India // Appl. Environ. Microbiol. — 2005. — Vol. 71(7). — P. 3575–3580.
9. Fabbri A., Falzano L., Frank C. et al. *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin modulates cytoskeletal organization and calcium homeostasis in intestinal cultured cells // Infect. Immun. — 1999. — Vol. 67(3). — P. 1139–1148.
10. Goshima K., Owaribe K., Yamanaka H., Yoshino S. Requirement of calcium ions for cell degeneration with a toxin (vibriolysin) from *Vibrio parahaemolyticus* // Infect. Immun. — 1978. — Vol. 22(3). — P. 821–832.
11. Hara-Kudo Y., Nishina T., Nakagawa H. et al. Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood // Appl. Environ. Microbiol. — 2001. — Vol. 67(12) — P. 5819–5823.
12. Honda T., Yuxin N., Miwatani T. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin // Infect. Immun. — 1988. — Vol. 56(4). — P. 961–965.
13. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // Nature. — 1970. — Vol. 227(5259). — P. 680–685.

14. Nair G. B., Ramamurthy T., Bhattacharya S. K. et al. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants // Clin. Microbiol. Rev. — 2007. — Vol. 20(1). — P. 39–48.
15. Nishibuchi M., Kaper J.B. Thermostable direct hemolysin gene and of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium // Infect. Immun. — 1995 — Vol. 63(6). — P. 2093–2099.
16. Pal D., Das N. Isolation, identification and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from fish samples in Kolkata // European Review for Medical and Pharmacological Sciences. — 2010. — Vol. 14(6). — P. 545–549.
17. Park K.S., Ono T., Rokuda M. et al. Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin — deletion mutant of *Vibrio parahaemolyticus* // Microbiol. Immunol. — 2004. — Vol. 48(4). — P. 313–318.
18. Sakurai J., Honda T., Jinguji Y. et al. Cytotoxic effect of the thermostable direct hemolysin produced by *Vibrio parahaemolyticus* on FL cells // Infect. Immun. — 1976. — Vol. 13(3). — P. 876–883.
19. Sujew A.K.W., Norrakiah A.S., Laina M. Prevalence of toxic genes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimps (*Penaeus monodon*) and culture environment // Int. Food Res. J. — 2009. — Vol. 16. — P. 89–95.
20. Thomas A., Straif-Bougeois S., Sokol T.M., Ratard R.S. *Vibrio* infections in Louisiana: twenty-five years of surveillance 1980–2005 // J. La State Med. Soc. — 2007. — Vol. 159(4). — P. 205–208, 210–211.
21. Yanagihara I., Nakahira K., Yamane T. et al. Structure and functional characterization of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin // J. Biol. Chem. — 2010. — Vol. 285(21). — P. 16267–16274.

Список сокращений:

TDH — термостабильный прямой гемолизин,
 TRH — TDH-родственный гемолизин,
 СА — сульфат аммония,
 FPLC — высокоэффективная жидкостная хроматография,
 ХОФ — хроматография в обращенной фазе,
 SDS — додецилсульфат натрия,
 MALDI-ToF — время-пролетная масс-спектрометрия,
 MS — масс-спектрометрия,
 НССА — α -циано-4-гидроксикоричная кислота

PRODUCTION OF THE THERMOSTABLE DIRECT HEMOLYSIN (TDH) OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

M.V. POLEEVA, O.S. CHEMISOVA, R.V. PISANOV, O.A. TSYRULINA

Research Institute for Plaque Control, Rostov-on-Don

We proposed a new method of obtaining and purification of thermostable direct TDH-hemolysin of *V. parahaemolyticus* which demonstrated the high degree of purification of the substance. MALDI-ToF mass spectrometry revealed the specific mass peaks corresponding to the TDH-hemolysin of *V. parahaemolyticus*.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, Thermostable Direct Hemolysin (TDH), FPLC chromatography, MALDI-ToF-mass-spectrometry.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КОЛЛЕКЦИИ РИЗОСФЕРНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ИБФРМ РАН

О.В. ТУРКОВСКАЯ*, А.Ю. МУРАТОВА, Е.В. ДУБРОВСКАЯ, С.Н. ГОЛУБЕВ

ФГБУН «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН» (ИБФРМ РАН), Саратов

Значимость Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН как ресурса для биотехнологии определяется таксономическим разнообразием поддерживаемых в ней штаммов, источниками выделения последних, которыми являются различные культурные и дикорастущие виды растений и окружающие их зоны, интеграцией в информационную сеть по ризосферным микробным ресурсам, ориентацией на пополнение описания коллекционных штаммов сведениями о наличии у них важных с биотехнологической точки зрения свойств. В представленном сообщении коллекционные микроорганизмы структурированы и охарактеризованы в рамках функциональных групп «биоудобрения», «фитостимуляторы» и «биоремедиаторы», а также экспериментально подтверждена пригодность использования ряда перспективных штаммов бактерий в эко/агротехнологиях.

Ключевые слова: коллекция микроорганизмов, биотехнология, PGPR, бактерии-деструкторы, техногенные загрязнители.

Введение

Коллекции микроорганизмов являются единственным способом сохранения разнообразия природных микробных ресурсов. Они имеют огромную важность для исследований и разработок в области медицинской, сельскохозяйственной и экологической биотехнологии.

В ИБФРМ РАН в 1981 году создана и продолжает развиваться Коллекция ризосферных микроорганизмов (ранее — Коллекция непатогенных микроорганизмов), являющаяся специализированным научным депозитарием, ориентированным на собрание и поддержание непатогенных бактерий, выделенных в основном из корневой зоны растений. Коллекция является членом Всемирной федерации коллекций культур (World Federation for Culture Collections, WFCC) под номером 975 и зарегистрирована во Всемирном центре данных о микроорганизмах (World Data Centre for Microorganisms, WDCM) под номером 1021.

В фондах Коллекции (www.collection.ibppm.ru) хранится около 500 культур бактерий различной таксономической принадлежности. Большинство культур выделено и депонировано сотрудниками ИБФРМ РАН, типовые штаммы получены из других коллекций.

Географическое происхождение штаммов охватывает такие страны, как Бразилия, Великобритания, Германия, Индия, Ирак, Канада, Китай, Литва, Пакистан, Португалия, Россия, Сенегал, США, Тайвань, Эквадор, Япония. Микроорганизмы выделялись преимущественно из органов растений и окружающих их зон (корни, семена, клубеньки, ризосфера, ризоплана, филосфера), а также из других экологических ниш: грунта, почвы и воды (как чистых, так и загрязненных нефтяными углеводородами, тяжелыми металлами/металлоидами, пестицидами и др.). Учитывая специфику коллекции, весьма ожидаемо, что большинство поддерживаемых штаммов адаптировано к жизни в ассоциации с растениями, произрастающими в разнообразных условиях, включая ниши, загрязненные пестицидами, нефтяными углеводородами и тяжелыми металлами. Среди таких штаммов могут быть экземпляры, повышающие жизнеспособность растений за счет усвоения питательных веществ, регуляции гормонального баланса, прямой или опосредованной защиты от биотических (болезни, вредители) и абиотических (дефицит воды, загрязнение и др.) стресс-факторов, улучшения структуры почв. В связи с этим коллекция представляется перспективным источником природных микробных ресурсов, которые могут быть востребованы для создания эффективных биопрепаратов сельскохозяйственного и экологического назначения. Чтобы этот ресурс сделать более полезным для конечного потребителя (исследователи, предприниматели), целесообразно дополнить описание поддерживаемых в коллекции штаммов сведениями о наличии у них важных с биотехнологической точки

© 2018 г. Турковская О.В., Муратова А.Ю., Дубровская Е.В., Голубев С.Н.

* **Автор для переписки:**

Турковская Ольга Викторовна

д.б.н., профессор, заведующий лабораторией экологической биотехнологии ИБФРМ РАН

E-mail: turkovskaya_o@ibppm.ru

зрения свойств. Решению этой задачи посвящено настоящее сообщение.

Материалы и методы

Хранение штаммов в коллекции осуществляется посредством криоконсервации (-70°C) в низкотемпературных морозильниках (Сапуо, Япония) и субкультивирования (с помощью периодических пересевов на полужидкий агар). Регулярно выполняется переконсервация и проверка культур на соответствие основным признакам. Культивирование проводится на соответствующих средах, указанных в Каталоге (www.collection.ibppm.ru).

Определение таксономической принадлежности поддерживаемых штаммов осуществляется на основе принципов полифазной таксономии, использующей информацию генотипического, филогенетического и фенотипического характера. Для исследований используется парк современного оборудования, локализованного в Центре коллективного пользования ИБФРМ РАН «Симбиоз» (www.ibppm.ru). В настоящее время в Коллекции зарегистрированы представители 29 бактериальных родов: *Acidovorax*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Aquaspirillum*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Ensifer*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Herbaspirillum*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Nitrospirillum*, *Niveispirillum*, *Nocardioides*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*. Ядро Коллекции составляет одно из крупнейших собраний представителей рода *Azospirillum* — типичных стимулирующих рост растений ризобактерий (PGPR, plant growth promotion rhizobacteria), являющихся общепризнанной моделью для изучения растительно-микробных взаимодействий.

Поддерживаемые в депозитории штаммы обладают рядом полезных для экологической и сельскохозяйственной биотехнологии свойств и условно отнесены к группам «биоудобрения», «фитостимуляторы» и «биоремедиаторы».

Результаты и обсуждение

Первые две группы включают в себя штаммы PGPR, которые стимулируют рост растений либо за счет улучшения питания благодаря азотификации и/или солиubilизации нерастворимых фосфатов («биоудобрения»), либо за счет продукции фитогормонов («фитостимуляторы») (Bhattacharyya Jha, 2012) [12].

Отнесение поддерживаемых коллекционных штаммов к PGPR проводится на основании выявления указанных способностей, а также по результатам вегетационных опытов.

Установлено, что 200 коллекционных штаммов проявляют свойства потенциальных биоудобрений и фитостимуляторов. Это представители родов *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Comamonas*, *Ensifer*, *Enterobacter*, *Moraxella*, *Pseudomonas*. Для ряда штаммов способность улучшать рост растений подтверждена в вегетационных экспериментах. Одни из наиболее активных представлены в таблице 1. Наиболее вероятное использование штаммов PGPR — сельскохозяйственная практика. Ярким примером этому может служить коллекционный штамм *Azospirillum zae* SR98G, который был успешно коммерциализирован группой компаний Bionovatic (<http://bionovatic.ru>) в виде биопрепарата «Органин Н». Основная функция этого препарата — улучшение азотного питания сельскохозяйственных культур за счет способности бактерии фиксировать атмосферный азот и переводить его в пригодные для потребления растением формы. Кроме того, он позволяет улучшить ростовые характеристики растений благодаря бактериальному синтезу фитогормонов. Согласно спецификации производителя, препарат эффективен на всех видах сельскохозяйственных культур (зерновые, зернобобовые, овощные, плодовые, ягоды, свекла сахарная, подсолнечник, кукуруза, картофель, виноград). Подобная фитостимулирующая эффективность показана также для хорошо известного модельного штамма *Azospirillum brasilense* Sp245 (например, Rothballer et al., 2003 [23]; Mangmang et al., 2015 [19]; Tkachenko et al., 2015 [25]).

Штаммы PGPR могут быть использованы и в фиторемедиационных технологиях. В этом случае их PGPR-активность благоприятствует разрастанию корневой системы растения, что, с одной стороны, обеспечивает прирост численности полезной ассоциированной с корнями микрофлоры благодаря появлению новых ниш, а с другой — повышает выделение с корневыми экссудатами катаболических ферментов для разрушения загрязнителей органической природы (например, нефтяных углеводородов) или, наоборот, улучшает экстракцию из прикорневой зоны неорганических загрязнителей (тяжелые металлы и металлоиды).

Отличительная особенность группы «биоремедиаторы» — разрушение персистентных органических поллютантов и/или проявление устойчивости к неорганическим.

Биодобрения и фитостимуляторы

Номер в коллекции	Вид, штамм	Источник выделения	Стимуляция роста растения		Ссылка
			Выявленное свойство	Растение	
IBPPM 5	<i>Azospirillum</i> sp. SR8	<i>Zerna inermis</i> L., корни	N ₂	<i>Triticum aestivum</i> (Saratovskaya 29)	Филиппчева, Бурьгин, 2016 [9]
IBPPM 7	<i>Azospirillum brasilense</i> SR15	<i>Dactylis glomerata</i> L., корни	N ₂	<i>Triticum aestivum</i> (Saratovskaya 29)	Филиппчева, 2011 [10]
IBPPM 13	<i>Azospirillum</i> sp. SR38	<i>Dactylis glomerata</i> L., проростки	N ₂	<i>Triticum aestivum</i> (Saratovskaya 29)	Филиппчева, Бурьгин, 2016 [9]
IBPPM 19	<i>Azospirillum</i> sp. SR61	<i>Triticum aestivum</i> (Saratovskaya 54), корни	N ₂	<i>Triticum aestivum</i> (Saratovskaya 29)	Филиппчева, Бурьгин, 2016 [9]
IBPPM 22	<i>Azospirillum brasilense</i> SR75	<i>Triticum aestivum</i> (Saratovskaya 29), проростки	N ₂	<i>Triticum aestivum</i> (Saratovskaya 29)	Филиппчева, 2011 [10]
IBPPM 24	<i>Azospirillum brasilense</i> SR80	<i>Triticum aestivum</i> (Saratovskaya 49), проростки	N ₂ , IAA	<i>Secale cereale</i> , <i>Lolium perrene</i> , <i>Sorghum bicolor</i> , <i>Triticum aestivum</i>	Муратова и др., 2005, 2010 [2, 3]
IBPPM 33	<i>Azospirillum brasilense</i> SR41	<i>Triticum aestivum</i> (Albidum 43), корни	N ₂	<i>Triticum aestivum</i> (Saratovskaya 29)	Филиппчева, Бурьгин, 2016 [9]
IBPPM 383	<i>Ensifer meliloti</i> P221	<i>Phragmites australis</i> , загрязненная ПАУ почва, ризоплана	N ₂ , IAA	<i>Sorghum bicolor</i> , <i>Medicago sativa</i>	Golubev et al., 2009, 2011 [15, 16]
IBPPM 472	<i>Pseudomonas</i> sp. K3	<i>Zea mays</i> L. spp. <i>mays</i> , ризоплана	P _i	<i>Sorghum saccharatum</i> (Saratovskoye-35)	Kryuchkova et al., 2013
IBPPM 476	<i>Enterobacter cloacae</i> K7	<i>Helianthus tuberosus</i> L., ризоплана	IAA, P _i	<i>Helianthus annuus</i> L. (Saratovsky-20)	Kryuchkova et al., 2013
IBPPM 588	<i>Azospirillum zeae</i> SR98G	<i>Triticum</i> sp., проростки	N ₂	культурные растения	Препарат «ОрганиТ Н» (http://bio-organic.ru)
IBPPM 219	<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	<i>Triticum</i> sp., корни	N ₂ , IAA	<i>Solanum tuberosum</i> L.	Tkachenko et al., 2015 [25]

Примечание: N₂ – азотификация, IAA – продукция индолил-3-уксусной кислоты, P_i – солибилизация неорганических фосфатов

Интерес к указанной группе микроорганизмов обусловлен, главным образом, тотальным загрязнением окружающей среды углеводородами нефти и продуктами ее переработки, пестицидами, тяжелыми металлами и металлоидами и возможностью улучшить экологическую ситуацию посредством относительно малозатратных и экологически безопасных технологий фиторемедиации, основанных на использовании растительно-микробных ассоциаций (Fatima et al., 2017) [14]. К этой функциональной группе относятся деструкторы сырой нефти, дизельного топлива и ПАУ, а также изоляты, обладающие устойчивостью к As³⁺, Cd²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺. В таксономическом плане они представлены следующими родами: *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Aquaspirillum*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*,

Bacillus, *Brachybacterium*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Ensifer*, *Enterobacter*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*. Бактерии-деструкторы, утилизируя персистентные органические загрязнители, снижают фитотоксичность загрязненного грунта, тем самым обеспечивая рост растений-партнеров. В таблице 2 представлены наиболее интересные коллекционные штаммы-деструкторы. Некоторые из них сочетают в себе признаки «биоремедиаторов» и «фитостимуляторов»/«биодобрений», что повышает их ценность как инокулянтов растений-фиторемедиантов (Муратова и др., 2005 [3]; Golubev et al., 2011 [15]). Это, в первую очередь, штаммы *Azospirillum* sp. SR14, *A. brasilense* SR42, *A. brasilense* SR80, *Ensifer meliloti* P221 и *Enterobacter cloacae* K7.

Таблица 2

Коллекционные штаммы бактерий, проявляющие способность к деградации техногенных загрязнителей

Номер в коллекции	Вид, штамм	Источник выделения	Загрязнитель	Ссылка
IBPPM 6	<i>Azospirillum</i> sp. SR14	<i>Festuca pratensis</i> Huds, корни	Нефть	Муратова и др., 2005 [3]
IBPPM 24	<i>Azospirillum brasilense</i> SR80	<i>Triticum aestivum</i> (Saratovskaya 49), проростки	Нефть	Муратова и др., 2005, 2010 [2, 3]; Бондаренкова, 2009 [1]
IBPPM 34	<i>Azospirillum brasilense</i> SR42	<i>Triticum aestivum</i> (Sarrubra), корни	Нефть	Муратова и др., 2005 [3]
IBPPM 333	<i>Pseudomonas kunmingensis</i> L3	<i>Medicago sativa</i> L., загрязненная углеводородами ризосфера	Фенантрен, нафталин	Golubev et al., 2009 [16]; Muratova et al., 2015 [20]
IBPPM 334	<i>Brachy bacterium</i> sp. Rsf2	<i>Medicago sativa</i> L., загрязненная углеводородами ризосфера	Антрацен, фенантрен, флюорен	Golubev et al., 2009 [16]
IBPPM 339	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> Ph3	<i>Sorghum bicolor</i> , загрязненная углеводородами ризосфера	Антрацен, фенантрен, флюорен, нафталин	Golubev et al., 2009 [16]
IBPPM 343	<i>Rhizobium petrolearium</i> P1	<i>Helianthus annuus</i> , загрязненная углеводородами ризосфера	Фенантрен, флюорен	Golubev et al., 2009 [16]
IBPPM 350	<i>Rhizobium petrolearium</i> Rsf11	<i>Medicago sativa</i> L., загрязненная углеводородами ризосфера	Фенантрен, флюорен	Golubev et al., 2009 [16]; Muratova et al., 2015 [20]
IBPPM 351	<i>Rhizobium petrolearium</i> P4	<i>Helianthus annuus</i> , загрязненная углеводородами ризосфера	Фенантрен, флюорен	Golubev et al., 2009 [16]
IBPPM 383	<i>Ensifer meliloti</i> P221	<i>Phragmites australis</i> , загрязненная ПАУ почва, ризоплана	Антрацен, фенантрен, флюорен, нафталин	Golubev et al., 2009, 2011 [15, 16]; Muratova et al., 2015 [20]
IBPPM 411	<i>Pseudomonas fluorescens</i> El-2.1	<i>Elodea canadensis</i> , перифитон	Нефть, нафталин, толуол, бензол, фенол	Тумайкина и др., 2008 [8]; Трегуб и др., 2009 [7]
IBPPM 413	<i>Kocuria rosea</i> El-4.3	<i>Elodea canadensis</i> , перифитон	Нафталин	Трегуб и др., 2009 [7]
IBPPM 428	<i>Brevundimonas diminuta</i> El-3.1	<i>Elodea canadensis</i> , перифитон	Нефть, фенол, нафталин, толуол, бензол	Тумайкина и др., 2008 [8]; Трегуб и др., 2009 [7]
IBPPM 430	<i>Aquaspirillum fasciculus</i> El-4.1	<i>Elodea canadensis</i> , перифитон	Нафталин, толуол	Трегуб и др., 2009 [7]
IBPPM 431	<i>Acidovorax delafieldii</i> El-1	<i>Elodea canadensis</i> , перифитон	Нафталин, толуол	Трегуб и др., 2009 [7]
IBPPM 476	<i>Enterobacter cloacae</i> K7	<i>Helianthus tuberosus</i> L., ризоплана	Глифосат	Kryuchkova et al., 2013
IBPPM 496	<i>Mycobacterium</i> sp. N7	<i>Phragmites australis</i> , загрязненная углеводородами ризосфера	Дизельное топливо	Бондаренкова, 2009 [1]
IBPPM 497	<i>Mycobacterium komosense</i> N8	<i>Vicia cracca</i> L., загрязненная углеводородами ризосфера	Дизельное топливо	Бондаренкова, 2009 [1]
IBPPM 527	<i>Acinetobacter</i> sp. Sh33	<i>Setaria viridis</i> L., загрязненная нефтепродуктами ризосфера	Нефть	Muratova et al., 2018 [22]
IBPPM 589	<i>Mycobacterium gilvum</i> PAM1	<i>Medicago sativa</i> L., загрязненная нефтепродуктами ризосфера	Антрацен, фенантрен, флюорантен, флюорен, пирен	Щербакова и др., 2016 [11]

Для ряда коллекционных штаммов из рассматриваемых функциональных групп характерна устойчивость к тяжелым металлам/металлоидам. Указанное свойство будет давать дополнительное преимущество для выживания своим носителям в условиях загрязнения. Это означает, что среди таких бактерий окажутся востребованными в биотехнологических разработках те, которые сами обладают свойствами деструкторов

и/или PGPR. Таким образом, в качестве кандидатов для практического использования могут рассматриваться штаммы *Aeromonas* sp. MG3, *Comamonas* sp. T3, *E. meliloti* P221, *Moraxella osloensis* 3.2, *M. osloensis* 3.4, *Mycobacterium* sp. N7, *Mycobacterium* sp. N8, *Pseudomonas kunmingensis* L3, *Rhizobium petrolearium* P1, *R. petrolearium* P2, *R. petrolearium* P4 и *Stenotrophomonas* sp. P422 (табл. 3).

Таблица 3

Коллекционные штаммы ризобактерий, устойчивые к тяжелым металлам и металлоидам

Номер в коллекции	Вид, штамм	Источник выделения	Биотехнологически значимое свойство	Устойчивость к металлам
IBPPM 333	<i>Pseudomonas kunmingensis</i> L3	<i>Medicago sativa</i> L., загрязненная углеводородами ризосфера	Деструктор ПАУ	Ni ²⁺
IBPPM 343	<i>Rhizobium petrolearium</i> P1	<i>Helianthus annuus</i> , загрязненная углеводородами ризосфера	Деструктор ПАУ	As ³⁺ , Ni ²⁺
IBPPM 347	<i>Stenotrophomonas</i> sp. P422	<i>Xanthium strumarium</i> , загрязненная углеводородами ризосфера	Деструктор ПАУ	Ni ²⁺ , Pb ²⁺
IBPPM 351	<i>Rhizobium petrolearium</i> P4	<i>Helianthus annuus</i> , загрязненная углеводородами ризосфера	Деструктор ПАУ	Ni ²⁺ , Pb ²⁺ , As ³⁺
IBPPM 353	<i>Rhizobium petrolearium</i> P2	<i>Helianthus annuus</i> , загрязненная углеводородами ризосфера	Деструктор ПАУ	Ni ²⁺
IBPPM 383	<i>Ensifer meliloti</i> P221	<i>Phragmites australis</i> , загрязненная ПАУ почва, ризоплана	PGPR, деструктор ПАУ	Ni ²⁺ , Pb ²⁺
IBPPM 462	<i>Aeromonas</i> sp. MG3	<i>Lemna gibba</i> , корни, загрязненная мышьяком вода	PGPR	Ni ²⁺ , Pb ²⁺ , As ³⁺ , Cd ²⁺
IBPPM 466	<i>Moraxella osloensis</i> 3.2	Дикий злак, корни, промзона	PGPR	As ³⁺ , Pb ²⁺
IBPPM 467	<i>Moraxella osloensis</i> 3.4	Дикий злак, корни, промзона	PGPR	As ³⁺ , Pb ²⁺
IBPPM 469	<i>Comamonas</i> sp. T3	Томат, корни	PGPR	As ³⁺ , Pb ²⁺
IBPPM 496	<i>Mycobacterium</i> sp. N7	<i>Phragmites australis</i> , загрязненная углеводородами ризосфера	Деструктор углеводов дизельного топлива	Ni ²⁺ , Pb ²⁺ , Cd ²⁺
IBPPM 497	<i>Mycobacterium komosense</i> N8	<i>Vicia cracca</i> L., загрязненная углеводородами ризосфера	Деструктор углеводов дизельного топлива	Ni ²⁺ , Pb ²⁺
IBPPM 600	<i>Bacillus cereus</i> 14	<i>Solanum nigrum</i> , ризосфера	PGPR	Cd ²⁺

Изучение возможностей оптимизации процессов фиторемедиации позволило разработать протоколы использования отдельных коллекционных штаммов в указанной технологии (Муратова и др., 2010) [2]. При этом подбор растений осуществляли на основе данных наших

многолетних наблюдений за состоянием растительного покрова на загрязненных территориях, изложенных в Атласе растений-фиторемедиантов (Панченко и др., 2015) [4]. Сконструированы растительно-микробные ассоциации для восстановления почв, загрязненных раз-

личными техногенными загрязнителями. Для очистки почвы от ПАУ рекомендованы ассоциации: люцерна посевная (*Medicago sativa*) – *E. meliloti* P221 (ИВРРМ 383) – Патенты РФ № 2406758 [6] и 2403102 [5]; сорго веничное (*Sorghum bicolor*) – *E. meliloti* P221 (ИВРРМ 383) – Патенты РФ № 2406758 и 2403102. Для очистки нефтезагрязненной почвы: рожь озимая (*Secale cereale*) – *A. brasilense* SR80 (ИВРРМ 24) – Патент РФ № 2403102; райграсс пастбищный (*Lolium perenne*) – *A. brasilense* SR80 (ИВРРМ 24) – Патент РФ № 2403102. Для очистки почвы от глифосата: подсолнечник однолетний (*Helianthus annuus*) – *Enterobacter cloacae* K7 (ИВРРМ 476). Для очистки почвы от тяжелых металлов и металлоидов (Pb, Cd и As): суданская трава (*Sorghum sudanense*) – *Aeromonas* sp. MG3 (ИВРРМ 462). Как показали полевые испытания, используя ассоциации рожь озимая/сорго веничное – *A. brasilense* SR80, полной очистки грунта от флуорена и фенантрена с исходными концентрациями 50 и 100 мг/кг соответственно можно добиться через 60 сут. Почва, загрязненная нефтешламом (11,6 г/кг), может быть очищена с помощью ассоциаций рожь озимая/райграсс пастбищный – *A. brasilense* SR80 на 70% за 120 сут. При культивировании ассоциации подсолнечник однолетний – *E. cloacae* K7 на загрязненной глифосатом почве (исходная концентрация 540 мг/кг) через 45 суток этот гербицид в почве не обнаруживался. Ассоциация суданская трава – *Aeromonas* sp. MG3 способна экстрагировать из почвы 37,6% мышьяка (от исходного содержания), 41,3% кадмия и 60% свинца за 70 суток. Вышеперечисленные растительно-микробные конструкции сравнимы по эффективности с фиторемедиационными системами, тестированными другими авторами (Huang et al., 2004 [17]; Santos et al. 2009 [24]; Malekzadeh et al., 2014 [18]).

Заключение

Таким образом, потенциально полезные для экологической и сельскохозяйственной биотехнологии свойства зафиксированы и охарактеризованы у достаточно большого числа бактериальных штаммов, поддерживаемых в Коллекции ризосферных микроорганизмов. Носители этих свойств – представители функциональных групп «биоудобрения», «фитостимуляторы» и «биоремедиаторы». Тестирование перспективных PGPR штаммов в качестве инокулянтов сельскохозяйственных культур показало, что они справляются с задачей повышения продуктивности своих

макропартнеров и, следовательно, могут быть взяты в разработку для создания на их основе биопрепаратов сельскохозяйственного назначения.

Пригодность использования в фиторемедиации микроорганизмов, сочетающих в себе свойства «биоудобрений», «фитостимуляторов» и «биоремедиаторов», также подтверждена экспериментально. Подобранные на их основе ассоциации с растениями показали свою эффективность при очистке почвы от углеводов нефти, глифосата, тяжелых металлов и мышьяка. Предложенные способы очистки почвы от нефтяных углеводов защищены патентами РФ.

В результате участия сотрудников коллекции в проекте 7-й Рамочной Программы Европейского Союза «Банки ризосферных микроорганизмов» (Banking Rhizosphere Micro-Organisms, BRIO #266106, 2011–2014 гг.), направленном на создание информационной сети по ризосферным микробиологическим ресурсам (Declerck et al, 2015) [13]. В эту сеть от ИВРРМ были включены штаммы, проявляющие свойства биоудобрений, разрушающие нефть/ПАУ/фосфонаты, устойчивые к тяжелым металлам/металлоидам. Описание каждого штамма в сети сопровождается данными по таксономии, методам выделения и идентификации, условиям хранения и культивирования, свойствам микроорганизмов с акцентом на биотехнологически значимые, а также литературными источниками. Подобная интеграция коллекций позволяет существенно расширить доступ потенциальных пользователей к биоресурсам ризосферного происхождения и облегчить поиск объектов с необходимыми характеристиками.

Литература

1. Бондаренкова А.Д. Стимулирующие рост растений ризобактерии в фиторемедиации почв, загрязненных углеводородами: дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 2009. – 162 с.
2. Муратова А.Ю., Бондаренкова А.Д., Панченко Л.В., Турковская О.В. Использование комплексной фиторемедиации для очистки почвы, загрязненной нефтешламом // Биотехнология. – 2010. – № 1. – С. 77–84.
3. Муратова А.Ю., Турковская О.В., Антонюк Л.П., Макаров О.Е., Позднякова Л.И., Игнатов В.В. Нефтеокисляющий потенциал ассоциативных ризобактерий рода *Azospirillum* // Микробиология. – 2005. – Т. 74. – № 2. – С. 248–254.
4. Панченко Л.В., Муратова А.Ю., Дубровская Е.В., Голубев С.Н., Березуцкий М.А., Турковская О.В. Атлас растений-фиторемедиантов. – Саратов: Научная книга, 2015. – 560 с.

5. Патент RU 2403102 С1, МПК В09С 1/10. Способ фиторемедиации грунта, загрязненного углеводородами (варианты) / А.Ю. Муратова, А.Д. Бондаренкова, С.Н. Голубев, Л.В. Панченко, О.В. Турковская. — Опубликовано 10.11.2010. Бюл. № 31. (Заявка № 2009118275, дата подачи 15.05.2009 г., патент № 2403102, дата выдачи 9.06.2010 г.).
6. Патент RU 2406758 С2, МПК С12N 1/20. Штамм бактерий *Sinorhizobium meliloti* — деструктор полициклических ароматических углеводородов и стимулятор роста растений для повышения эффективности фиторемедиации / А.Ю. Муратова, С.Н. Голубев, О.В. Турковская. — Опубликовано 20.12.2010. Бюл. № 35. (Заявка № 2009108374, дата подачи 11.03.2009, патент № 2406758, дата выдачи 20.07.2010 г.).
7. Трегуб А.С., Тумайкина Ю.А., Гольдфейн М.Д. Исследование детоксикации толуола под воздействием водной растительно-микробной ассоциации // Проблемы региональной экологии. — 2009. — № 5. — С. 75–80.
8. Тумайкина Ю.А., Турковская О.В., Игнатов В.В. Деструкция углеводородов и их производных растительно-микробной ассоциацией на основе элодеи канадской // Прикл. биохим. и микробиол. — 2008. — Т. 44. — № 4. — С. 422–429.
9. Филиппчева Ю.А., Бурьгин Г.Л. Серологическая и ростстимулирующая характеристики рода *Azospirillum*, выделенных в Саратовской области // Аграрный научный журнал. — 2016. — № 3. — С. 44–48.
10. Филиппчева Ю.А. Эколого-физиологические и серологические свойства бактерий рода *Azospirillum* различных растительно-бактериальных сообществ: дис. ... канд. биол. наук. — Саратов, 2011. — 152 с.
11. Щербакова Е.В., Гринев В.С., Чернышова М.П., Голубев С.Н., Муратова А.Ю. Деградация полициклического ароматического углеводорода пирена ризосферным штаммом *Mycobacterium gilvum* РАМ1 // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: Материалы VIII Всероссийской конференции молодых ученых, 26–30 сентября 2016 г. — Саратов, 2016. — С. 35.
12. Bhattacharyya P.N., Jha D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture // World J. Microbiol. Biotechnol. — 2012. — Vol. 28. — P. 1327–1350.
13. Declerck S., Willems A., van der Heijden M.G., Varese G.C., Turkovskaya O., Evtushenko L., Ivshina I., Desmeth P. PERN: An EU-Russia initiative for rhizosphere microbial resources // Trends Biotechnol. — 2015. — Vol. 33. — P. 377–380.
14. Fatima K., Imran A., Naveed M., Afzal M. Plant-bacteria synergism: An innovative approach for the remediation of crude oil-contaminated soil // Soil Environ. — 2017. — Vol. 36. — No. 2. — P. 93–113.
15. Golubev S.N., Muratova A.Yu., Wittenmayer L., Bondarenkova A.D., Hirche F., Matora L.Yu., Merbach W., Turkovskaya O.V. Rhizosphere indole-3-acetic acid as a mediator in the *Sorghum bicolor*-phenanthrene-*Sinorhizobium meliloti* interactions // Plant Physiology and Biochemistry — 2011. — Vol. 49. — P. 600–608.
16. Golubev S.N., Schelud'ko A.V., Muratova A.Yu., Makarov O.E., Turkovskaya O.V. Assessing the potential of rhizobacteria to survive under phenanthrene pollution // Water Air Soil Pollut. — 2009. — Vol. 198. — P. 5–16.
17. Huang X.-D., El-Alawi Y., Penrose D.M., Glick B.R., Greenberg B.M. Responses of three grass species to creosote during phytoremediation // Environ. Pollut. — 2004. — Vol. 130. — P. 453–463.
18. Malekzadeh E., Alikhani H. A., Savaghebi-Firoozabadi G. R., Zarei M. Bioremediation of cadmium-contaminated soil through cultivation of maize inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria // Bioremediation Journal. — 2012. — Vol. 16. — No. 4. — P. 204–211.
19. Mangmang J.S., Deaker R., Rogers G. Early seedling growth response of lettuce, tomato and cucumber to *Azospirillum brasilense* inoculated by soaking and drenching // Hort. Sci. (Prague) — 2015. — Vol. 42. — P. 37–46.
20. Muratova A., Dubrovskaya E., Golubev S., Grinev V., Chernyshova M., Turkovskaya O. The coupling of the plant and microbial catabolisms of phenanthrene in the rhizosphere of *Medicago sativa* // J. Plant Physiol. — 2015. — Vol. 188. — P. 1–8.
21. Muratova A., Lyubun Y., German K., Turkovskaya O. Effect of cadmium stress and inoculation with a heavy-metal-resistant bacterium on the growth and enzyme activity of *Sorghum bicolor* // Environ. Sci. Pollut. Res. — 2015. — Vol. 22. — P. 16098–16109.
22. Muratova A.Yu., Panchenko L.V., Semina D.V., Golubev S.N., Turkovskaya O.V. New strains of oil-degrading microorganisms for treating contaminated soils and wastes // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. — 2018. — Vol. 107. — 012066.
23. Rothballer M., Schmid M., Hartmann A. In situ localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties // Symbiosis. — 2003. — Vol. 34. — P. 261–279.
24. Santos J.B., Ferreira, E.A., Fialho, C.M.T., Santos, E.A., Galon L., Concenço G., Asiazú I., Silva A.A. Biodegradation of glyphosate in rhizospheric soil cultivated with *Glycine max*, *Canavalia ensiformis* and *Stizolobium aterrimum* // Planta Daninha, Viçosa-MG. — 2009. — Vol. 27. — No. 4. — P. 781–787.
25. Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Boikova N.V., Matora L.Yu., Burygin G.L., Lobachev Yu.V., Shchyogolev S.Yu. Improved potato microclonal reproduction with the plant growth-promoting rhizobacteria *Azospirillum* // Agron. Sustain. Dev. — 2015. — Vol. 35. — P. 1167–1174.

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF THE COLLECTION OF RHIZOSPHERE MICROORGANISMS IBFRM RAS

O.V. TURKOVSKAYA, A.Yu. MURATOVA, E.V. DUBROVSKAYA, S.N. GOLUBEV

*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms of the Russian Academy of Sciences
(IBPPM RAS), Saratov*

The importance of the IBPPM RAS Collection of Rhizosphere Microorganisms as a biotechnology resource is determined by the taxonomic diversity of the strains maintained in it, which were isolated from various wild and cultivated plants and from the zones around them. The importance of the collection is also determined by the fact that it is part of the network of information on rhizosphere microbial resources and is oriented to supplementing the descriptions of the collection strains with data on biotechnologically important properties. This communication characterizes the collection microorganisms as belonging to three functional groups (biofertilizers, phytostimulants, and bioremediators) and supplies experimental proof for the usability of several promising bacterial strains in eco/agrotechnology.

Keywords: collection of microorganisms, biotechnology, PGPR, bacteria-destructors, man-made pollutants.

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ КОМПОЗИЦИЙ ГИДРОЛИЗАТОВ ИЗ ГИДРОБИОНТОВ

Н.А. ГОЛУБЬ, В.И. РЯБУШКО*, Е.А. БОЧАРОВА

ФГБУН «Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН», Севастополь

Разработаны биотехнологические критерии получения композиции гидролизатов мяса морских моллюсков — мидии *Mytilus galloprovincialis* и брюхоногого моллюска *Rapana venosa* в лиофилизированной форме, которая сбалансирована по аминокислотному скору и имеет высокую биологическую ценность. Показано, что гидролизаты протеиновой природы с высоким содержанием свободных аминокислот, в частности, глицина и аланина, пригодны для сублимизационной сушки с получением кристаллического воздушно-сыпучего порошкообразного лиофизата, который можно использовать для фасовки в желатиновые капсулы, что позволяет получить препараты с улучшенными органолептическими показателями и увеличенными сроками хранения.

Ключевые слова: гидробионты, гидролизаты, лиофилизированные субстанции, аминокислотный скор.

Введение

В настоящее время диетология решает задачи получения нутрицевтиков, имеющих сбалансированный протеиновый, аминокислотный, жирокислотный, микроэлементный состав и обладающих высокой пищевой и биологической ценностью. Одним из наиболее ценных источников получения нутрицевтиков, имеющих как богатый аминокислотный состав, так и уникальные по химическому строению и биологической активности соединения, являются гидробионты [4, 8, 19]. Некоторые виды гидробионтов в настоящее время выращивают в условиях аквакультуры и их могут использовать как самостоятельное сырье [18], для получения биологически активных добавок (БАД) и удобрений из отходов переработки моллюсков или рыбы [21]. Наиболее известными примерами получения БАД из моллюсков являются гидролизаты мидий [10], например, «МИГИ-КЛП»; рапаны [12], например, «Рапанин»; рапаны и мидии [9], например, «Рапамид»; гребешка [13]; кальмаров [11], например, «Кальмарин». Как правило, эти гидролизаты обладают специфическим вкусом, присущим сырью, и высоким содержанием хлорида натрия, что снижает их органолептическую привлекательность. Также недо-

статком этих гидролизатов является несбалансированный аминокислотный скор, поскольку он определяется видоспецифичностью сырьевого источника и лимитирован по 2–3 незаменимым аминокислотам, что снижает биологическую ценность продуктов на их основе. Помимо этого, одним из недостатков данных биопрепаратов является ограниченный срок хранения жидких форм гидролизатов, обычно не превышающий 1 года.

Известно, что в ряде случаев гидролизаты проявляют большую биологическую активность в сравнении с исходным сырьем [23]. Так, из-за образования меланоидинов как реакции сахаров и аминокислот, увеличения содержания свободных тиоловых групп, в результате расщепления S-S связей цистеина повышается антиоксидантная активность гидролизатов. Кроме того, пептиды морского генезиса обладают антибактериальным, антидиабетическим, противогрибковым, противовоспалительным, антипротозойным, противотуберкулезным, противовирусным и иммуномодулирующим действием [22].

Одним из известных способов получения белок- и пептидосодержащих препаратов длительного хранения является лиофильное высушивание [3, 14]. Однако применительно к лиофилизации белоксодержащих гидролизатов часто возникает необходимость замораживания и кристаллизации препаратов с высоким (10–15%) содержанием хлорида натрия. В качестве решения этой технологической задачи в состав гидролизатов вводят нейтральный полисахарид.

Для получения стабильных лиофилизированных субстанций часто используют смеси аминокислот, в част-

© 2018 г. Голубь Н.А., Рябушко В.И., Бочарова Е.А.

* **Автор для переписки:**

Рябушко Виталий Иванович

д.б.н., гл. научн. сотр. отдела аквакультуры и морской фармакологии ФГБУН ФИЦ ФГБУН «Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН», Севастополь

E-mail: rabushko2006@yandex.ru

ности, глицин или аланин, и полиолов, например, маннит. Так, показано, что присутствие глицина в лиофилизате вызывает кристаллизацию находящихся в растворе молекул во время стадии замораживания [17]. Это, в свою очередь, повышает эффективность процесса лиофилизации на стадии сублимации, а также закристаллизованное вещество стабилизирует белки на время высушивания [25]. Вследствие увеличения удельной поверхности кристаллов по отношению к аморфной форме, облегчается теплообмен и повышается эффективность сушки, снижение содержания в лиофилизате остаточной воды и повышение стабильности, что позволяет хранить препараты при более высокой температуре [17]. Аналогично и аланин в кристаллической форме дает возможность увеличивать удельную поверхность лиофилизата и быстрее осуществлять высушивание субстанции [1]. К недостаткам такого способа можно отнести меньшую скорость растворения вещества в аморфной форме, а также возможность потери активности лиофилизированных белков [2]; поэтому в ряде случаев при содержании в препаратах нативных белков следует избегать кристаллизации эксципиентов [24].

Таким образом, белковые гидролизаты возможно лиофилизировать и получать препараты с увеличенным сроком хранения. Кроме этого, белковые гидролизаты уже содержат в своем составе свободные аминокислоты. Гидролизаты в силу разрушения высокомолекулярных белков теряют иммуногенность, а низкомолекулярные пептиды не преципитируют и не агрегируют с пептидами другого гидролизата. Это позволяет комбинировать гидролизаты, полученные из различных гидробийонтов, с целью добиться сбалансированного аминокислотного состава [16], и получить препарат, по аминокислотному составу близкий к эталонному с высокой биологической ценностью.

Цель настоящей работы — разработка технологии получения биопрепаратов на основе композиции гидролизатов мяса мидий *Mytilus galloprovincialis* Lam. 1819 и брюхоногого моллюска *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) в лиофилизированной форме, сбалансированных по аминокислотному скору, без применения полисахаридов в качестве эксципиента для получения рыхлого аморфного состояния лиофилизата.

Материалы и методы

Для получения гидролизата использовали культивируемую мидию *M. galloprovincialis* (марихозайство в Карантинной бухте, г. Севастополь) и рапану *R. venosa*. Мидию, измельченную со створкой, гидролизировали щелочью (1% NaOH). Гидролиз мягких тканей рапаны,

отделенных от раковины, проводили соляной кислотой (6–8% HCl). Композицию ЦЕРЕБРОМИД получали нейтрализацией щелочного мидийного гидролизата кислотным гидролизатом рапаны, согласно патенту UA № 69143 [15]. Содержание гидролизата рапаны составляло 6–10% общего объема ЦЕРЕБРОМИДа. Полученную композицию упаривали под вакуумом до содержания сухих веществ 25%, определенных по ГОСТ 28562-90 [5]. Лиофилизацию композиции проводили в лиофильной сушилке LZ-9. Растворы ЦЕРЕБРОМИДа, содержащие 5–10% сухих веществ, автоклавируют при 114 °С в течение 30 мин в предварительно разлитых в стерильные инфузионные флаконы объемом 500 см³ по 100 см³ или 200 см³. Флаконы замораживали при температуре хладреагента -40 °С при непрерывном вращении. В результате этого на боковой стенке флакона образовывался слой препарата толщиной 4–10 мм. Затем флаконы помещали в кювету сублимационной камеры и нагревали до -30±3 °С при вакууме 11–15 мм рт. ст. Сушку проводили при температуре +40 °С. Аминокислотный состав гидролизатов определяли в депротеинизированных пробах на аминокислотном анализаторе Т-109 [15, 20]. Определение влажности полученных образцов проводили согласно ГОСТ 7636-85 [6].

Результаты и обсуждение

Композицию ЦЕРЕБРОМИД, темно-коричневую жидкость со специфическим грибно-мидийным вкусом, содержанием соли 15–20% и растворенных сухих веществ 25±1%, сравнивали по аминокислотному скору и биологической ценности с препаратом РАПАМИД. Установлено, что композиция ЦЕРЕБРОМИД более сбалансирована по аминокислотному скору и, соответственно, имеет большую биологическую ценность, чем препарат РАПАМИД, полученный только из одной мидии (табл. 1).

Таблица 1

Аминокислотный скор и биологическая ценность препаратов РАПАМИД и ЦЕРЕБРОМИД

Аминокислота	Скор, %	
	РАПАМИД	ЦЕРЕБРОМИД
Лизин	161	100
Треонин	222	76
Цистин+метионин	135	286
Валин	171	56
Изолейцин	156	99
Лейцин	144	101
Тирозин+фенилаланин	229	136
Общая сумма АК, мг	757,12	812,52
Биологическая ценность, %	74,6	51,4

Аминокислотный состав препаратов РАПАМИД и ЦЕРЕБРОМИД

Кислота	Количество, мг/100 г		Функция аминокислоты в организме человека
	РАПАМИД	ЦЕРЕБРОМИД	
Лейцин	49,75	41,46	Входит в состав всех природных белков, применяется для лечения болезней печени, анемий и других заболеваний.
Лизин	43,25	45,63	Необходима для роста и восстановления тканей, производства антител, гормонов, ферментов, альбуминов.
Аргинин	31,85	2,59	Гепатопротектор, иммуномодулятор, используется в кардиологии, в послеоперационный период, в геронтологии и онкологии, для ожоговых больных, больных ВИЧ/СПИД.
Треонин	28,22	39,38	Образование природных белков.
Фенилаланин	25,26	22,19	Стабилизация белковых структур, является составной частью функциональных центров.
Валин	23,72	45,46	Лечение наркомании, алкоголизма, депрессии, множественного склероза.
Метионин	16,96	13,30	Донор метильных групп (в составе S-аденозил-метионина).
Изолейцин	16,02	32,04	Участвует в энергетическом обмене. При недостаточности ферментов, катализирующих декарбоксилирование изолейцина, возникает кетоацидоз.
Гистидин	8,07	2,69	Способствует росту и восстановлению тканей. Используется при лечении ревматоидных артритов, аллергий, язв и анемии. Недостаток гистидина может вызывать ослабление слуха.
Триптофан	Триптофан присутствует, но количество не определяли		Комплексная терапия больных с алкогольной, опиатной и барбитуратной зависимостью. Лечение острой интоксикации этанолом, маниакальной депрессии и депрессии, связанной с менопаузой.
Глутаминовая кислота	111,48	87,79	Используется в качестве хирального строительного блока в органическом синтезе
Глицин	94,64	122,02	Проникает в большинство биологических жидкостей и тканей организма, в том числе в головной мозг.
Аспарагиновая кислота	90,29	91,72	Играет важную роль в обмене азотистых веществ, участвует в образовании пиримидиновых оснований и мочевины, является критически важной для роста и размножения лейкозных клеток при некоторых видах лимфолейкоза.
Аланин	82,86	109,33	Превращается в печени в глюкозу и наоборот. Этот процесс носит название глюкозо-аланинового цикла и является одним из основных путей глюконеогенеза в печени.
Серин	48,19	60,73	Участвует в построении почти всех природных белков.
Пролин	31,15	23,96	Формирование коллагена в организме человека.
Тирозин	30,29	27,98	Подавляет аппетит, способствует уменьшению отложения жиров, выработке меланина и улучшает функции надпочечников, щитовидной железы и гипофиза.
Таурин	14,06	27,34	Ретинопротекторное, противокатарактное, метаболическое действие, обладает гепатопротекторными, кардиотоническими и гипотензивными свойствами.
Орнитин	7,28	6,47	Стимулирует реакцию образования мочевины из аммиака в орнитинном цикле мочевинообразования.
Цистин	1,13	2,50	Антиоксидантное, детоксикационное, гепатотропное, иммуномодулирующее, репаративное, ранозаживляющее, отхаркивающее и муколитическое действие, Улучшает структуру кожи, волос, ногтей и др.
Сумма	757,12	812,52	

Препараты РАПАМИД и ЦЕРЕБРОМИД содержат 20 свободных аминокислот, играющих важную роль в жизнедеятельности человека (табл. 2).

Препараты на основе гидролизатов мяса моллюсков обладают выраженным антиатеросклеротическим действием на сосуды головного мозга, нормализуют состав крови, обладают антиоксидантной и иммуномо-

дулирующей активностью [7]. Аминокислотный состав РАПАМИДа лимитирован по таким незаменимым аминокислотам, как лизин и метионин, что приводит к снижению биологической ценности препарата. При исследовании аминокислотного состава препаратов РАПАМИД и ЦЕРЕБРОМИД выявлено высокое содержание глицина и аланина (рис. 1).

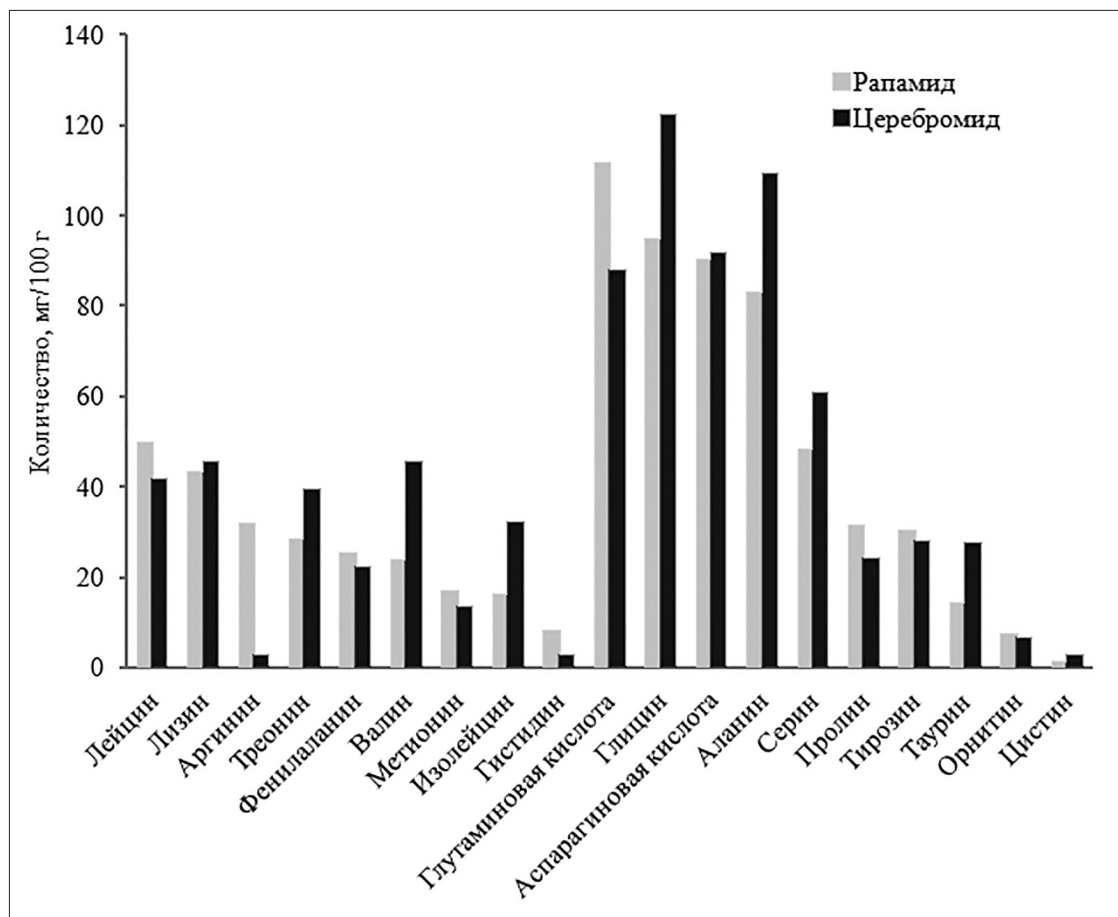


Рис. 1. Состав свободных аминокислот препаратов РАПАМИД и ЦЕРЕБРОМИД

Наличие достаточно высоких концентраций данных аминокислот может оказывать положительное влияние на кристаллизацию препаратов в процессе замораживания и ускорять процесс сублимации [1, 17], а также стабилизировать протеины во время сушки [25]. В то же время установлено, что готовая жидкая композиция ЦЕРЕБРОМИД не может быть лиофилизирована из-за высокого содержания соли (15–20%). При $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ происходит фазовое расслоение раствора, что затрудняет процесс лиофилизации композиции. Чтобы решить эту проблему, были проведены эксперименты по разведению препарата до содержания растворенного сухого вещества 10 и 5% в дозировках по 100 и 200 см³ в инфузионных флаконах емкостью 500 см³ с последующей сушкой.

Показано, что испарение воды вызывает вспенивание лиофилизата, в результате чего в горловине флакона образуется пробка, препятствующая испарению влаги. Повышение температуры приводит к оттаиванию препарата (подгару) и повышению давления паров воды в процессе сублимации во всех флаконах с содержанием препарата 200 см³ с последующим выбросом содержимого флакона в камеру сублимационной сушки. Также от-

мечено явление подгара и выброса содержимого флакона при концентрации растворенного сухого вещества 10% в дозировке 100 см³ в инфузионном флаконе емкостью 500 см³.

Установлено, что для обеспечения приемлемых условий сушки препарата без потерь в процессе сублимации допускается загрузка 5% раствора препарата в дозировке 100 см³ в инфузионном флаконе емкостью 500 см³, что соответствует 1900 мл исходного объема субстанции за один цикл лиофилизации длительностью до 72 час. Можно улучшить характеристики получения конечного продукта с содержанием сухих веществ $93,3 \pm 0,18\%$, выполнив процесс сушки в плоской кювете сублиматора. На выходе получается кристаллический рассыпчатый порошок кремово-коричневого цвета; длительность цикла снижена до 36 час. Характеристики конечного продукта и сравнение образцов, полученных сушкой во флаконах и кювете, приведены в таблице 3.

Лиофилизированный препарат ЦЕРЕБРОМИД пригоден для фасовки в желатиновые капсулы без применения полисахаридов в качестве обязательного эксципиента получения рыхлого аморфного состояния лиофилизата.

**Характеристика лиофилизированных образцов гидролизатов,
полученных в сублиматоре во флаконах и кювете**

Образец	Объем препарата до сушки, л	Содержание сухих веществ, %	Масса конечного продукта, г	Характеристика продукта
В инфузионных флаконах	1,9	92,45	76,92	Комковатый порошок серого цвета, нуждается в измельчении
В кювете сублимационной сушилки	1,5	93,30	62,38	Кремово-коричневый кристаллический воздушно-сыпучий порошок

Таким образом, показана возможность получения препаратов из гидролизатов гидробионтов, сбалансированных по аминокислотному составу и содержащих 15–20% хлорида натрия, в лиофилизированной форме, пригодной для фасовки в желатиновые капсулы. При этом происходит потеря иммуногенных свойств белков в процессе гидролиза и сохраняется высокое содержание в гидролизатах таких аминокислот, как глицин и аланин, 12,50 и 10,94% соответственно, по крайней мере, в случае использования в качестве сырья моллюсков мидии и рапаны.

Заключение

В результате исследования установлен уровень допустимой загрузки гидролизатов морских моллюсков, сбалансированных по аминокислотному составу, в сублиматор, обеспечивающий приемлемые условия сушки препарата. Продемонстрирована возможность получения лиофилизированного сырья, пригодного для фасовки в желатиновые капсулы без применения полисахаридов. Перевод подобного рода препаратов в лиофилизированную форму решает ряд проблем, характерных для жидких гидролизатов, — увеличения срока хранения препарата и улучшения органолептических свойств для потребления из-за специфического вкуса гидролизированных морепродуктов с высоким содержанием соли. Дальнейшие исследования в данном направлении позволят расширить сырьевую базу получения гидролизатов из гидробионтов. Среди других сырьевых источников можно использовать культивируемые в марихозиях различные виды моллюсков и рыб, либо отходы их переработки, что будет способствовать комплексной переработке продукции

ферм, снижению загрязнения окружающей среды и повышению экономических показателей таких производств.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № 0828-2019-0004-6 «Исследование механизмов управления производственными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса», № госрегистрации АААА-А18-118021350003-6.

Литература

1. Артюков А.А. Разработка биотехнологических основ получения некоторых биологически активных веществ из океанического сырья: автореф. дис. на соискание уч. степ. д-ра биол. наук. — Владивосток, 2012. — 48 с.
2. Белоус А.М., Цветков Ц.Д. Научные основы технологии сублимационного консервирования. — Киев: Наук. думка, 1985. — 208 с.
3. Голубь Н.А., Бочарова Е.А. Практические подходы к конструированию БАД из гидробионтов / Актуальные вопросы современной науки. Международная научная конференция МДК-2015-04 (14–15 сентября 2015). Издательский центр Русальянс «Сова»: Интернет-проект «Наука и образование on-line». — 2015. — С. 39–48. [Электронный ресурс] <http://eee-science.ru/course/view.php?id=72>.
4. Голубь Н.А., Ерохин В.Е., Рябушко В.И. Биотехнология получения продукта лечебно-профилактического назначения из двустворчатого моллюска мидии // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2015. — Т. 11. — № 2. — С. 11–19.
5. ГОСТ 28562-90. Рефрактометрический метод определения растворимых сухих веществ.

6. ГОСТ 7636-85. Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа.
7. Кузнецов В.В., Лисянский Н.И., Рябушко В.И., Ерохин В.Е., Скрипченко А.Г. Влияние гидролизата из морских моллюсков Рапамид на функциональное состояние мозга и иммунную систему у пациентов с начальными проявлениями атеросклеротической дисциркуляторной энцефалопатии // Журнал неврологии им. Б.М. Маньковского. — 2014. — Т. 2. — № 1. — С. 79–88. doi: 10.17116/jnevro2015115314-8.
8. Новикова М.В., Беседина Т.В., Рехина Н.И. Сравнительная характеристика биологически активных добавок из гидробионтов и отходов их разделки // Прикладная биохимия и технология гидробионтов: Труды ВНИРО / Под ред. А.В. Подкорытова. — М.: Изд-во ВНИРО, 2004. — Т. 143. — С. 124–133.
9. Патент UA 102291. МПК: A23L 1/333, A61K 35/56, A61P 9/10. Спосіб одержання лікувально-профілактичної композиції / Єрохін В.Є., Голуб М.О., Рябушко В.І.; власник: Інститут біології південних морів ім. О.О. Ковалевського НАН України. — № ГР а 2011 10651; заявл. 05.09.2011; опубл. 25.06.2013, Бюл. № 12.
10. Патент РФ 2017439. МПК A23L 1/333 (1990.01), A23J 1/04 (1990.01). Продукт из мяса мидий и способ его получения / Лагунов Л.Л., Рехина Н.И., Беседина Т.В., Новикова М.В., Королев А.Н., Паренкова Л.Ю., Телегина Т.А., Терентьев В.А., Ордуханян Н.И., Сысоева Л.В. Патентообладатели: Рехина Н.И., Беседина Т.В., Новикова М.В. — № 92005368/13; заявл. 12.11.1992; опубл. 15.08.1994.
11. Патент РФ 2093040. МПК A23J 1/04 (1995.01), A23L 1/333 (1995.01). Продукт из белок- и углеводсодержащего сырья водного происхождения и способ его получения / Беседина Т.В., Буга С.А., Королев А.Н., Конопляников А.Г., Новикова М.В., Рехина Н.И., Чимиров Ю.И. Патентообладатели: Рехина Н.И., Беседина Т.В., Новикова М.В. — № 94008589/13; заявл. 14.03.1994; опубл. 20.10.1997.
12. Патент РФ 2183414. МПК A23L 1/30 (2000.01), A23L 1/325 (2000.01), A23L 1/333 (2000.01). Биологически активная добавка и способ ее получения / Новикова М.В., Беседина Т.В., Чимиров Ю.И. Патентообладатель: Новикова М.В. — № 2000130797/13; заявл. 09.12.2000; опубл. 20.06.2002, Бюл. № 17.
13. Патент РФ 2192149. МПК A23L 1/30 (2000.01), A23L 1/333 (2000.01), A23J 1/04 (2000.01). Биологически активная добавка и способ ее получения / Новикова М.В., Беседина Т.В., Чимиров Ю.И. Патентообладатель: Федеральное государственное унитарное предприятие «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии». — № 2001106807/13; заявл. 15.03.2001; опубл. 10.11.2002, Бюл. № 31.
14. Патент РФ 2261623. МПК A23L1/03, A61K35/56 Способ лиофильной сушки биопрепарата / Абрамова Л.С., Новикова М.В., Беседина Т.В., Чимиров Ю.И., Борк Д.А. Патентообладатель: ФГУП Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО). — № 2004114899/15; заявл. 18.05.2004; опубл. 10.10.2005, Бюл. №28.
15. Патент UA 69143. МПК A61K35/56, A23L1/333. Способ получения лечебно-профилактической композиции «Церебромид» / Ерохин В.Е., Рябушко В.И., Голубь Н.А. Патентообладатель: Институт биологии южных морей им. А.А. Ковалевского. — № ГР U 201110650; заявл. 05.09.2011; опубл. 25.04.2012. Бюл. № 8.
16. Пивненко Т.Н. Ферментативные гидролизаты из гидробионтов Тихого океана как основа для создания биологически активных добавок к пище и продуктов функционального питания. — Владивосток: Дальнаука, 2015. — 160 с.
17. Промышленная технология лекарств. Под ред. профессора В.И. Чуешова. Учебник в 2-х т. Том 2. — Харьков: МТК-Книга; Издательство НФАУ, 2002. — 716 с.
18. Рехина Н.И. Океан источник здоровья и долголетия. — М.: Издательство Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО), 2001. — 94 с.
19. Стоник В.А. Морские природные соединения. Путь к новым лекарственным препаратам // Acta Nature. — 2009. — Т. 1(2). — С. 16–27.
20. Тринеева О.В. Методы контроля качества аминокислот в фармацевтическом анализе (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. — 2015. — № 11. — С. 120–138.
21. ФАО. Состояние мирового рыболовства и аквакультуры 2018. — Достижения целей устойчивого развития. Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций. Рим. Лицензия: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. — 2018. — 209 с. ISBN 978-92-5-130690-1.
22. Hee Kyoung Kang, Moon-Chang Choi, Chang Ho Seo, Yoonkyung Park. Therapeutic properties and biological benefits of marine-derived anticancer peptides // Int. J. Mol.Sci. — 2018. — Vol. 19(3). — P. 919. doi: 10.3390/ijms19030919.
23. Hermansky M., Pesak M. Lyophilization of drugs / VI Amorphous and Crystalline forms // Ceskoslovenska Farmacie. — 1993. — No. 42(2). — P. 95–98.
24. Kim S.K., Wejesekeara I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review // Journal of Functional Foods. — 2010. — Vol. 2. — P. 1–9. doi: 10.1016/j.jff.2010.01.003.
25. Pital M.J. Freeze-drying of proteins // BioPharm. — 1990. — Vol. 3. — P. 26–30.

TECHNOLOGY FOR PRODUCING LYOPHILIZED COMPOSITIONS OF HYDROLYSATES FROM HYDROBIONTS

N.A. GOLUB, V.I. RYABUSHKO, E.A. BOCHAROVA

Kovalevsky A.A. Institute of Marine Biological Research, RAS, Sevastopol

On the example of obtaining the composition of hydrolysates from different types of mollusks, biotechnological approaches to obtain mixtures of amino acid-balanced speed and high biological value are considered. It is shown that hydrolysates of protein nature, with a high content of free amino acids, particularly glycine and alanine, suitable for sublimational drying with obtaining crystalline air of free-flowing powdery lifesite that can be used for encapsulation in gelatin capsules, which allows to obtain preparations with improved organoleptic characteristics and increased storage time.

Keywords: hydrobionts, hydrolysates, sublimation substance, amino acid score.

АНТИТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОТИВОХОЛЕРНОГО ЭНТЕРОСОРБЦИОННОГО ПРЕПАРАТА В ОПЫТАХ IN VIVO

М.В. ОВЧИННИКОВА*, Е.Г. АБРАМОВА, Т.Ю. КИРИЛЛОВА,
И.А. ПЛОТНИКОВ, А.К. НИКИФОРОВ, А.К. АДАМОВ

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

В экспериментах на биомоделях установлены показатели остаточной токсичности и коэффициент нейтрализации, характеризующие специфическое действие как компонентов экспериментального препарата, так и препарата в целом. Определено, что применение экспериментального энтеросорбента обуславливало снижение показателя титра холерного токсина в сравнении с микрочастицами хитозана, антитоксическими иммуноглобулинами и препаратом сравнения. Преимущество экспериментального препарата также продемонстрировано на модели кроликов-сосунков при внутрикишечном введении холерного токсина — энтеросорбент способствовал купированию холерогенного синдрома и, как следствие, повышению процента выживших животных. Экспериментальные данные свидетельствуют, что сконструированный энтеросорбционный препарат, обладающий высокой специфической нейтрализующей активностью в отношении экзотоксина холерного вибриона, является перспективным лечебно-профилактическим средством против холеры.

Ключевые слова: холера, энтеросорбенты, холерный токсин, биомодели.

Введение

Проблема этиопатогенетической терапии острых кишечных инфекций занимает существенное место в современной медицине в связи с их повсеместным распространением [6, 7, 11], утяжелением клинического течения отдельных нозологических форм, развитием резистентности возбудителей к традиционно применяемым этиотропным препаратам [9]. В патогенезе ряда инфекционных заболеваний имеют большое значение степень специфической и неспецифической интоксикации, состояние иммунитета и естественной детоксикации организма, а при кишечных инфекциях — нарушение структуры и функции желудочно-кишечного тракта под действием различных вирусных и бактериальных возбудителей.

Известно, что в основе клинических проявлений холеры лежит синдром электролитной диареи, развитие которой заключается в гиперсекреторных процессах, обусловленных активацией фермента аденилатциклазы в эпителиальных клетках тонкой кишки под действием

холерного экзотоксина [2, 3]. Каскад таких патологических процессов, как выраженные нарушения белкового и липоуглеводного обмена с накоплением токсичных промежуточных метаболитов, возникновение резких нарушений коагуляционного потенциала, реологических свойств и клеточного состава периферической крови и нарастание эндогенной интоксикации приводят к полиорганной недостаточности и развитию критических состояний. Первоочередным и самым эффективным методом лечения больных холерой является патогенетическая терапия [8, 10], которая направлена на восстановление и сохранение водно-электролитного баланса, а также на нейтрализацию и выведение токсинов из организма, уничтожение возбудителя [5, 11]. Этиотропная терапия при холере не является решающей и может быть ограничена антибиотикорезистентностью возбудителя, утяжелением клинического течения болезни, связанного с неблагоприятным преморбидным фоном, наличием противопоказаний к применению. Широкое и нередко бесконтрольное использование этиотропных средств часто оказывается не только малоэффективным, но и сопровождается нежелательными побочными эффектами и может иметь неблагоприятные последствия для организма больного.

В настоящее время все больше внимания уделяется лекарственным средствам, позволяющим отказаться в ряде случаев от традиционно применяемых в лечении антибактериальных препаратов за счет усиления патогене-

© 2018 г. Овчинникова М.В., Абрамова Е.Г., Кириллова Т.Ю., Плотников И.А., Никифоров А.К., Адамов А.К.

* Автор для переписки:

Овчинникова Мария Владимировна,
к.б.н., зав. лабораторией диагностических препаратов,
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»

E-mail: begemot2006@list.ru

нетической терапии, исходя из принципа минимального неблагоприятного воздействия на организм больного. В этой связи представляют интерес энтеросорбенты, которые сегодня являются обязательным компонентом комплексной терапии различных патологических состояний, сопровождающихся эндо- и экзотоксикозами. Несмотря на значительное многообразие и возможность выбора современных энтеросорбционных препаратов, вопросы разработки новых комбинированных/комплексных энтеросорбентов, расширяющих спектр их лечебного и профилактического действия, актуальны и требуют для своего решения системных подходов.

Ключевым моментом при разработке новых энтеросорбционных средств является конструирование высокоспецифичных и стабильных препаратов, не только выполняющих свои «очищающие» функции, но и способных осуществлять функции носителя для доставки, дозированного выделения и пролонгации действия биологически активных целевых продуктов.

С этой целью был разработан экспериментальный противохолерный антитоксический энтеросорбент следующего состава:

- энтеросорбционный компонент — хитозан кислото-растворимый (1,4- β -D-глюкан) (ЗАО «Биопрогресс», Россия), молекулярная масса — 200 кДа, размер частиц — от 1 до 150 мкм, сорбирующая поверхность — 100–250 м² на 1 г, степень деацетилирования — 83%. Хитозан обладает низким раздражающим действием на слизистую оболочку кишки, мукоадгезивен, высоко биосовместим, существенно повышает биодоступность трудно-растворимых веществ в крови, биодеградирует. Обилие водородных связей в структуре хитозана способствует связыванию полисахаридом большого количества органических водорастворимых веществ, в том числе бактериальных токсинов, образующихся в толстой кишке в процессе пищеварения [1]. При этом хитозан имеет ряд преимуществ перед другими энтеросорбентами, не вызывая побочных эффектов при применении, таких как сорбция из организма важных питательных веществ и развитие констипационного синдрома;
- антитоксический компонент — антитоксические иммуноглобулины, выделенные из сыворотки крови кроликов, иммунизированных холерным токсином. Специфическая активность взятых в эксперимент иммуноглобулинов составила в до-иммуноанализе 1:2000, в реакции иммунодиффузии — 1:32.

Целью настоящей работы являлось изучение антитоксической активности разработанного энтеросорбционного препарата и его компонентного состава в экспериментах на биомоделях.

Материалы и методы

Определение антитоксической активности исследуемых образцов в двух тестах. Первый тест — тест отека задней конечности [4] проводили на 300 особях белых беспородных мышей *Mus musculus* обоего пола массой 18–20 г. Животные были разделены на 4 опытные и 1 контрольную группы по 60 особей в каждой. Второй тест по определению нейтрализующей активности проводили на модели кроликов-сосунков 8–10-дневного возраста массой 10–12 г при внутрикишечном введении холерного токсина по Датта и Хаббу [13] в модификации А.К. Адамова [3]. Было использовано 20 особей животных по 4 кролика в каждой группе.

Препаратом сравнения был выбран коммерческий энтеросорбент Полисорб-МП, оказывающий неспецифическое бактериостатическое действие на патогенную флору и обладающий выраженным дезинтоксикационным эффектом при инфекционных заболеваниях желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

Известно, что внутривенное введение холерного токсина вызывает гибель многих видов лабораторных животных; внутрикишечное введение взрослым кроликам 0,4 мкг холерного токсина вызывает наполнение лигированных петель тонкой кишки. У крольчат 8–10-дневного возраста диарея и наполнение толстой кишки наблюдаются после внутрикишечного введения 2–10 мкг энтеротоксина холерного вибриона [2, 3].

В биологических методах оценки влияния сконструированного антитоксического энтеросорбента и его компонентного состава на активность холерного токсина использовали феномен увеличения проницаемости мембран капилляров при внутрикожном введении токсина биомоделям [4, 12], а также феномен активирования секреции кишечного сока при пероральном или внутрикишечном введении токсина экспериментальным животным [2, 3].

Тест отека задней конечности. Исследуемые образцы — экспериментальный энтеросорбент, микро-частицы хитозана и Полисорб-МП в количестве 1 г смешивали с 10 мл рабочего разведения холерного токсина (1000 ЕД₅₀/мл), антитоксические иммуноглобулины вводили в раствор холерного токсина в количестве 100 мг. Смесь тщательно гомогенизировали. Пробы инкуби-

рвали в течение 1 ч при температуре $37,0 \pm 1,0$ °С, после чего центрифугировали на высокоскоростной центрифуге при 14000 об/мин в течение 10 мин, декантировали супернатант. Каждую пробу пятикратно разводили 0,9% раствором натрия хлорида и вводили животным в подоживенную поверхность одной задней конечности в объеме 50 мкл. В противоположную конечность животного вводили в том же объеме контрольный раствор — 0,9% раствор натрия хлорида. Через 48 ч проводили эвтаназию животных хлороформом. Опытную и контрольную конечности ампутировали по коленному суставу и проводили их взвешивание. По разнице в весе более 65 мг между опытной и контрольной конечностями оценивали степень нейтрализации холерного токсина в каждой пробе. Расчет титра токсина до и после его взаимодействия со специфическим энтеросорбентом проводили по методу Кербера в модификации Ашмарина, по формуле:

$$\lg ED_{50} = \lg DN - \lg d(\sum Li - 0,5),$$

где $\lg DN$ — логарифм наибольшей из испытанных доз; $\lg d$ — логарифм каждой последующей дозы к предыдущей (шаг разведения); $\sum Li$ — сумма отношений числа животных с наблюдаемым эффектом от данной дозы к общему количеству животных, которым была введена данная доза.

Эффективность токсин-нейтрализующей активности оценивали по показателям остаточной токсичности холерного токсина до и после взаимодействия с активными субстанциями по формуле:

$$OT = \frac{C_0}{C_k} \times 100\%,$$

где OT — остаточная токсичность; C_0 — концентрация токсина в опытной пробе; C_k — концентрация токсина в контроле.

Согласно определенной величине остаточной токсичности определяли коэффициент инактивации холерного токсина специфическим энтеросорбентом и препаратом сравнения по формуле:

$$Ki = \frac{1}{OT} \times 100,$$

где Ki — коэффициент инактивации; OT — остаточная токсичность.

Внутрикишечное введение холерного токсина по Дамта и Хаббу в модификации А.К. Адамова. При изучении специфических антитоксических механизмов при развитии холеры было доказано, что антитоксические антитела быстро нейтрализуют холерные экзотоксины как *in vitro*, так и *in vivo* [3]. Полная нейтрализация ток-

синов наблюдается только при условии, что антитоксины вводятся до введения экзотоксина или одновременно [3]. Исходя из этого, исследуемые образцы — экспериментальный энтеросорбент, микрочастицы хитозана и Полисорб-МП в количестве 1 г смешивали с 10 мл раствора холерного токсина в конечной концентрации 10 мкг/мл, антитоксические иммуноглобулины в количестве 100 мг вводили в раствор холерного токсина. Смеси инкубировали в течение 1 ч при температуре $37,0 \pm 1,0$ °С. Далее пробы центрифугировали, супернатант декантировали и вводили в количестве 0,2 мл внутрикишечно лабораторным животным. Кроликам-сосункам контрольной группы вводили 10 мкг/мл холерного токсина в том же объеме 0,9% раствора натрия хлорида. За животными вели наблюдение в течение 48 ч. Павших животных вскрывали, оценивая патологоанатомическую картину.

Результаты и обсуждение

В ходе работы по результатам теста отека задней конечности была выявлена высокая токсин-нейтрализующая способность сконструированного энтеросорбента в отношении холерного токсина как с исходными компонентами, так и с препаратом сравнения. Об этом свидетельствовали снижение титра токсина в реакционных смесях и показатели относительной токсичности (табл. 1).

Таблица 1

Показатели нейтрализации холерного токсина в тесте отека задней конечности

Объект исследования	Показатели инактивации токсина*		
	Титр токсина, ЕД ₅₀ /50 мкл		Относительная токсичность, %
	до взаимодействия с объектом исследования	после взаимодействия с объектом исследования	
Микрочастицы хитозана	38,6±1,4	28,8±1,13	74,6±0,5
Специфические противохолерные иммуноглобулины		8,5±1,02	22,2±0,3
Экспериментальный энтеросорбент		4,9±0,53	12,01±1,35
Полисорб-МП		12,3±0,6	31,86±0,4

Примечание: * — результаты представлены в виде средних значений определяемых величин по данным трех экспериментов с вероятностью 95%

Анализ эффективности нейтрализации холерного токсина специфическим экспериментальным препаратом, исходными компонентами энтеросорбента и препаратом сравнения показал, что экспериментальный энтеросорбент проявлял высокую антитоксическую активность, превосходя по инактивации холерного токсина микрочастицы хитозана, исходные антитоксические иммуноглобулины и Полисорб-МП на 84,0, 46,3 и 63,0% соответственно, что иллюстрирует рисунок 1.

Результаты эксперимента по внутрикишечному введению холерного токсина представлены в таблице 2.

Полученные данные свидетельствовали о том, что специфический энтеросорбент купировал развитие диареи и наполнение толстой кишки у 1 экспериментального животного из 6 взятых в опыт (83,4%). Антитоксические иммуноглобулины подавляли развитие диареи и наполнение толстой кишки у 2 экспериментальных животных из 6, что составило 66,7%. Микрочастицы хитозана, выступающие в роли матрицы-носителя специфического компонента, не обладали выраженной антитоксической активностью, подавляя наполнение толстой кишки и развитие диареи у четырех экспериментальных животных из шести. Аналогичные показатели были получены в опыте с препаратом сравнения (рис. 2).

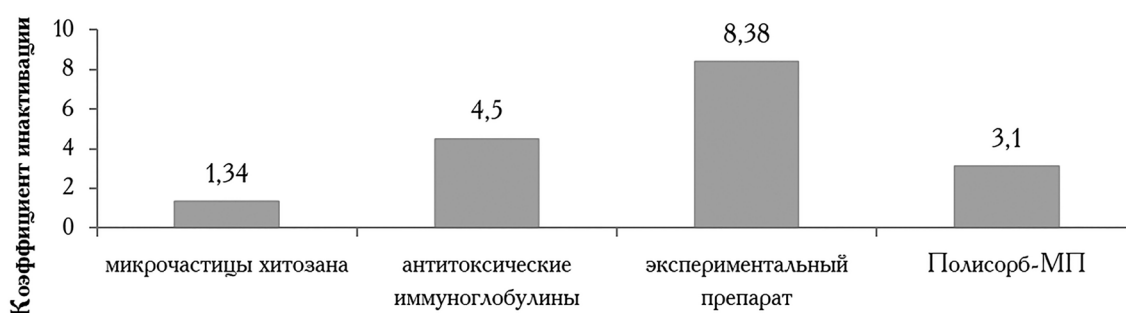


Рис. 1. Показатели антитоксической активности экспериментального энтеросорбента, его исходных компонентов и препарата сравнения в тесте отека задней конечности на белых мышах

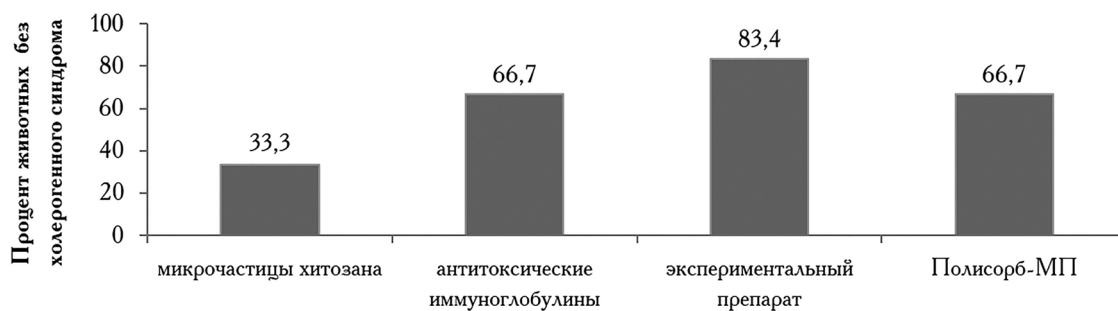


Рис. 2. Токсиннейтрализующая активность иммуносорбента при внутрикишечном введении холерного токсина экспериментальным животным

Таким образом, в ходе проведенных исследований установлено, что все компоненты, входящие в состав экспериментального энтеросорбента и препарата сравнения Полисорб-МП, обладают более или менее выраженным антитоксическим действием в отношении холерного токсина. Определено, что применение экспериментального энтеросорбента обуславливает эффективное снижение титра холерного токсина $ED_{50}/50$ мкл с $38,6 \pm 1,4$ $ED_{50}/50$ мкл до $4,9 \pm 0,53$ $ED_{50}/50$ мкл в сравнении с исходными компонентами — микрочастицами хитозана,

антитоксическими иммуноглобулинами и препаратом сравнения; титр холерного токсина после взаимодействия с данными активными субстанциями составил $28,2 \pm 1,13$, $8,5 \pm 1,02$ и $12,3 \pm 0,6$ соответственно. Опыт на модели кроликов-сосунков при внутрикишечном введении холерного токсина показал, что применение экспериментального препарата способствует купированию холерогенного синдрома и, как следствие, позволяет увеличить процент выживших животных с 33,3 и 66,7% — для микрочастиц хитозана и Полисорба-МП, соответственно, до 83,4%.

Таблица 2

Токсиннейтрализующая активность исследуемых образцов на модели кроликов-сосунков

Объект исследования	№ животного	Наличие холерогенного синдрома	Патологоанатомическая картина вскрытого животного
1	2	3	4
Экспериментальный энтеросорбент	1	-	Патологии не отмечено
	2	-	-«-
	3	-	-«-
	4	+	Растяжение толстой кишки в результате наполнения прозрачной желтоватой жидкостью. В тонкой кишке отмечено накопление небольшого количества жидкости и слизи. Сосуды брыжейки инъецированы
	5	-	Патологии не отмечено
	6	-	-«-
Антитоксические иммуноглобулины	1	+	Растяжение толстой кишки в результате наполнения прозрачной желтоватой жидкостью. В тонкой кишке отмечено накопление небольшого количества жидкости и слизи. Сосуды брыжейки инъецированы
	2	+	-«-
	3	-	Патологии не отмечено
	4	-	-«-
	5	-	-«-
	6	-	-«-
Микрочастицы хитозана	1	+	Растяжение толстой кишки в результате наполнения прозрачной желтоватой жидкостью. В тонкой кишке отмечено накопление небольшого количества жидкости и слизи. Сосуды брыжейки инъецированы
	2	+	-«-
	3	+	-«-
	4	+	-«-
	5	-	Патологии не отмечено
	6	-	-«-
Полисорб-МП	1	+	Растяжение толстой кишки в результате наполнения прозрачной желтоватой жидкостью. В тонкой кишке отмечено накопление небольшого количества жидкости и слизи. Сосуды брыжейки инъецированы
	2	+	-«-
	3	+	-«-
	4	+	-«-
	5	-	Патологии не отмечено
	6	-	-«-
Контроль	1	+	Растяжение толстой кишки в результате наполнения прозрачной желтоватой жидкостью. В тонкой кишке отмечено накопление небольшого количества жидкости и слизи. Сосуды брыжейки инъецированы
	2	+	-«-
	3	+	-«-
	4	+	-«-
	5	+	-«-
	6	+	-«-

Заключение

Экспериментальные данные свидетельствуют, что сконструированный антитокический энтеросорбент — препарат, обладающий высокой специфической нейтрализующей активностью в отношении экзотоксина холерного вибриона в опытах, является перспективным препаратом для дальнейшего изучения с целью создания эффективного и безопасного иммунобиологического лечебно-профилактического средства против холеры.

Литература

1. Авдошенкова О.Г., Иванов Р.В., Максвитис Р.Й. Применение препарата энтеродез в терапии интоксикационного синдрома инфекционной этиологии // *Главный врач*. — 2010. — № 2 (21). — С. 50–53.
2. Адамов А.К., Наумишина М.С. Холерные вибрионы: монография; под ред. Н.Г. Пономарева. — Саратов: Изд-во Саратовского университета, 1984. — 328 с.
3. Адамов А.К. Иммунология холеры: монография под ред. Н.П. Жукова-Вережникова. — Саратов: Изд-во Саратовского университета, 1981. — 320 с.
4. Дурихин К.В., Попова А.Е. Количественная оценка биологической активности фильтратов культуры холерного вибриона (холерогена) на белых мышцах // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. — 1974. — № 9. — С. 52–56.
5. Малеев В.В. Нарушение водно-солевого обмена и его коррекция у больных холерой и пищевыми токсикоинфекциями: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1988. — 35 с.
6. Москвитина Э.А., Толенева Е.Г., Кругликов В.Д., Титова С.В., Водопьянов А.С., Куриленко М.Л., Пакскина Н.Д., Иванова С.М., Анисимова Г.Б., Водопьянов С.О., Олейников И.П. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2008–2017 гг. прогноз на 2018 г. // *Проблемы особо опасных инфекций*. — 2018. — № 1. — С. 36–43.
7. Онищенко Г.Г., Галимова Г.Х., Трифонов В.А. и др. Организация и проведение дезинфекционных мероприятий в очаге холеры // *Казанский медицинский журнал*. — 2002. — Т. 83. — № 6. — С. 459–460.
8. Покровский В.И., Малеев В.В. Холера. — М.: Медицина, 1978. — 231 с.
9. Супотницкий М.В. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий // *Биопрепараты*. — 2011. — № 2. — С. 34–44.
10. Ющук Н.Д., Венгеров Ю.Я. Инфекционные болезни: национальное руководство. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. — 1056 с.
11. Ющук Н.Д., Венгеров Ю.Я. Лекции по инфекционным болезням. 3-е изд., перераб. и доп. — М.: ОАО «Издательство медицина», 2007. — 1032 с.
12. Craig J.P. A permeability factor (toxin) found in cholera stools and culture filtrates and its neutralization by convalescent cholera sera // *Nature*. — 1965. — Vol. 207. — P. 614–616.
13. Dutta N.K., Habbu M.K. Experimental cholera in infant rabbits: a method for chemotherapeutic investigation // *Brit. J. Pharmacol.* — 1955. — Vol. 256(23). — P. 12252–12256.
14. Pierce N.F., Greenough W.B. 3rd, Carpenter C.C. Jr. Vibrio cholerae enterotoxin and its mode of action // *Bacteriol. Rev.* — 1971. — Vol. 35(1). — P. 1–13.

ANTITOXIC ACTIVITY OF CHOLERA ENTEROSORPTION DRUG IN VIVO EXPERIMENTS

M.V. OVCHINNIKOVA, E.G. ABRAMOVA, T.Yu. KIRILLOVA,
I.A. PLOTNIKOV, A.K. NIKIFOROV, A.K. ADAMOV

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov

In experiments on biomodels, indicators of residual toxicity and neutralization coefficient were established, characterizing the specific action of both the components of the experimental drug and the preparation as a whole. It was determined that the use of experimental enterosorbent caused a decrease in the index of cholera toxin titer in comparison with chitosan microparticles, antitoxic immunoglobulins and a comparator drug. The advantage of the experimental drug was also demonstrated on the model of suckling rabbits with intractable administration of cholera toxin - enterosorbent helped to arrest the cholera syndrome and, as a result, increase the percentage of surviving animals. Experimental data indicate that the designed enterosorption drug, which has a high specific neutralizing activity against the cholerae elixant exotoxin, is a promising therapeutic and prophylactic agent against cholera.

Keywords: cholera, entericos, cholera toxin, biomodels.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛНОЙ ГЕНОМНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ *VIBRIO CHOLERAЕ*

М.П. ПОГОЖОВА*, Н.Е. ГАЕВСКАЯ, Р.В. ПИСАНОВ, А.С. ВОДОПЬЯНОВ,
Л.В. РОМАНОВА, С.О. ВОДОПЬЯНОВ, А.В. ТЮРИНА, А.О. КОЧЕТКОВА, С.Н. ГОЛОВИН

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

Изучение биологических и генетических особенностей бактериофагов холерного вибриона — одно из приоритетных направлений исследований в области предупреждения и ликвидации распространения заболевания. В настоящей работе мы сообщаем полную геномную последовательность бактериофагов Rostov-1 и Rostov-6. При помощи биоинформационного анализа проведено сравнение их с другими известными фагами, опубликованными в базе данных Genbank (NCBI). *Vibrio phage Rostov-1* является литическим и может быть использован для фагодиагностики, а также как компонент лечебно-профилактического препарата. *Vibrio phage Rostov-6* успешно используется в экспериментальной научно-исследовательской работе, а также для конструирования диагностических препаратов. Наличие интегразы затрудняет его использование в фаготерапии. Полные геномные последовательности фагов Rostov-1 и Rostov-6 зарегистрированы и доступны в международной базе Genbank (NCBI) под номерами MG957431 и MH105773 соответственно.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, полная геномная последовательность, секвенирование, *Podoviridae*, бактериофаги, *Vibrio phage Rostov-1*, *Vibrio phage Rostov-6*.

Введение

В настоящее время холера представляет собой значительную угрозу для здравоохранения во всем мире и является эндемичной в странах Южной Азии, Африки, Карибского бассейна, несмотря на непрекращающиеся усилия ограничить ее распространение. Эпидемии холеры могут возникать не только в эндемичных районах, но и в странах, где болезнь не выявлялась более сотни лет [6, 11]. Эти данные подчеркивают постоянную уязвимость населения во многих странах от вспышки заболевания. Штаммы *V. cholerae* присутствуют в окружающей среде как компонент водной экосистемы и могут вызвать секреторную диарею у людей, что может привести к дегидратации и смерти, если будет отсутствовать лечение [12, 14].

Все чаще ученые обнаруживают *Vibrio cholerae* с измененным геномом и повышенным уровнем антибиотикорезистентности [7]. В результате молекулярно-генетических исследований выявлена связь генетических

детерминант факторов патогенности бактерий с профагом и отмечена возможность генетического обмена не только между бактериями и фагами, но и между фагами и эукариотами [3]. Одним из факторов окружающей среды, имеющих важное значение в возникновении эпидемий холеры, характере течения инфекционного процесса и его угасания, является наличие бактериофагов *V. cholerae* [4]. Изучение биологических и генетических особенностей бактериофагов холерного вибриона — одно из приоритетных направлений исследований в области предупреждения и ликвидации распространения заболевания.

Бактериофаги холерных вибрионов представляют собой группу вирусов, характеризующихся широким морфологическим и генетическим разнообразием. При помощи современных технологий можно получать данные о генетической организации бактериофагов, которые используются для идентификации и характеристики вируса. Также знания о генетической структуре существенны при определении пригодности фага для конструирования диагностических и лечебно-профилактических препаратов, безопасных для живого организма и окружающей среды. Анализ генома холерных фагов позволяет обнаружить либо доказать отсутствие каких-либо генетических детерминант факторов патогенности [2, 5]. С помощью полногеномного секвенирования можно определить жизненный цикл бактериофага: умеренный или виру-

© 2018 г. Погожова М.П., Гаевская Н.Е., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Романова Л.В., Водопьянов С.О., Тюрина А.В., Кочеткова А.О., Головин С.Н.

* Автор для переписки:

Погожова Марина Павловна

м.н.с. лаборатории бактериофагов Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора

E-mail: pogojova_mp@antiplague.ru

лентный. В настоящее время только в ходе выявления генов, кодирующих интегразы, можно подтвердить умеренность бактериофага. Интегразы представляют собой ферменты, которые осуществляют однонаправленную сайт-специфическую рекомбинацию между двумя последовательностями распознавания ДНК, сайтом присоединения фагов — *attP* и сайтом бактериального присоединения — *attB* [13]. Если у бактериофага нет гена интегразы, то его идентифицируют как вирулентный. Определение полной геномной последовательности дает возможность не только установить таксономическое положение бактериофага, но и оценить его функциональную значимость.

Целью нашего исследования явилась характеристика геномов бактериофагов *Vibrio cholerae*, выделенных из окружающей среды, при помощи полногеномного секвенирования.

Материалы и методы

В исследование были взяты бактериофаги Rostov-1 и Rostov-6. Литическая активность и специфичность были определены общепринятыми методами [10]. Для подготовки к электронно-микроскопическому исследованию препарат бактериофагов центрифугировали, отбирали супернатант и вносили в него ПЭГ 6000. Далее центрифугировали, удаляли супернатант, а осадок ресуспендировали деионизованной водой. Затем наносили препарат на сеточки для электронной микроскопии и контрастировали 2% водным раствором уранилацетата. После высушивания образцы просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1011. Электронограммы получены при помощи CDC-камеры Olympus-SIS-Veleta и программного обеспечения iTEM-TEM imaging Platform.

Количество и качество выделенной ДНК контролировали электрофорезом в 0,8%-ном агарозном геле. Качество полученных препаратов фаговой ДНК исследовали, подвергая их гидролизу эндонуклеазами рестрикции, а также в ПЦР [8, 12, 13]. Отсутствие бактериальных хромосом в пробах подтверждали методом ПЦР с использованием ген-специфичных праймеров [1]. Раствор фаговой ДНК хранили при температуре -20 °С.

Геномная последовательность бактериофагов была определена с использованием одного из методов высокопроизводительного секвенирования (high-throughput sequencing). ДНК фагов секвенирована с помощью полногеномного секвенатора Miseq (Illumina).

В ходе биоинформационного анализа проверяли качество прочтений секвенированных нуклеотидных последовательностей, исправляли ошибки и выравнивали короткие фрагменты чтения (риды). Сборку геномов осуществляли с использованием специализированного программного обеспечения (ассемблеров), позволяющего объединять риды в продолжительные последовательности (контиги). Сравнение собранных геномов бактериофагов с аннотированными геномами известных бактериофагов проводили при помощи алгоритма blastn и доступных баз данных нуклеотидных последовательностей фагов.

Результаты и обсуждение

Бактериофаг Rostov-1 обладает способностью лизировать более широкий массив штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы, биовара *El Tor* по сравнению с другими холерными фагами. *Vibrio phage* Rostov-6 активен в отношении *V. cholerae* O1 серогруппы, биоваров Classical и *El Tor*, в том числе и к антибиотикоустойчивому штамму *V. cholerae* *El Tor* 19243 (стрептомицин, фуразолидон, триметоприм/сульфаметоксазол, налидиксовая кислота). Спектр литической активности — 64,4%. Бактериофаги были выделены из окружающей среды (из водоема). Исследованные фаги устойчивы к воздействию хлороформа и инактивируются при температуре 60 °С в течение 30 минут. Специфичность фагов в отношении хозяина подтверждена на большом наборе представителей близкородственных микроорганизмов семейств *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, которые не лизировали испытуемые фаги. *Vibrio phage* Rostov-1 и *Vibrio phage* Rostov-6 активно используются в научно-исследовательской работе, а также для разработки новых диагностических препаратов.

Морфологический анализ методом электронной микроскопии показал, что исследованные бактериофаги являются головчатыми и принадлежат к III морфогруппе по классификации Тихоненко А.С. [8], а также к типу С семейства *Podoviridae* ДНК-содержащих хвостатых фагов по классификации Aскерманн Н.В. [9] (рис. 1).

Анализ нуклеотидных последовательностей продемонстрировал, что размеры геномов бактериофагов Rostov-1 и Rostov-6, 37247 п.н. и 39934 п.н. с общим количеством ORF 39 и 15 соответственно; также обнаружены гены, характерные для хвостатых фагов (табл. 1).

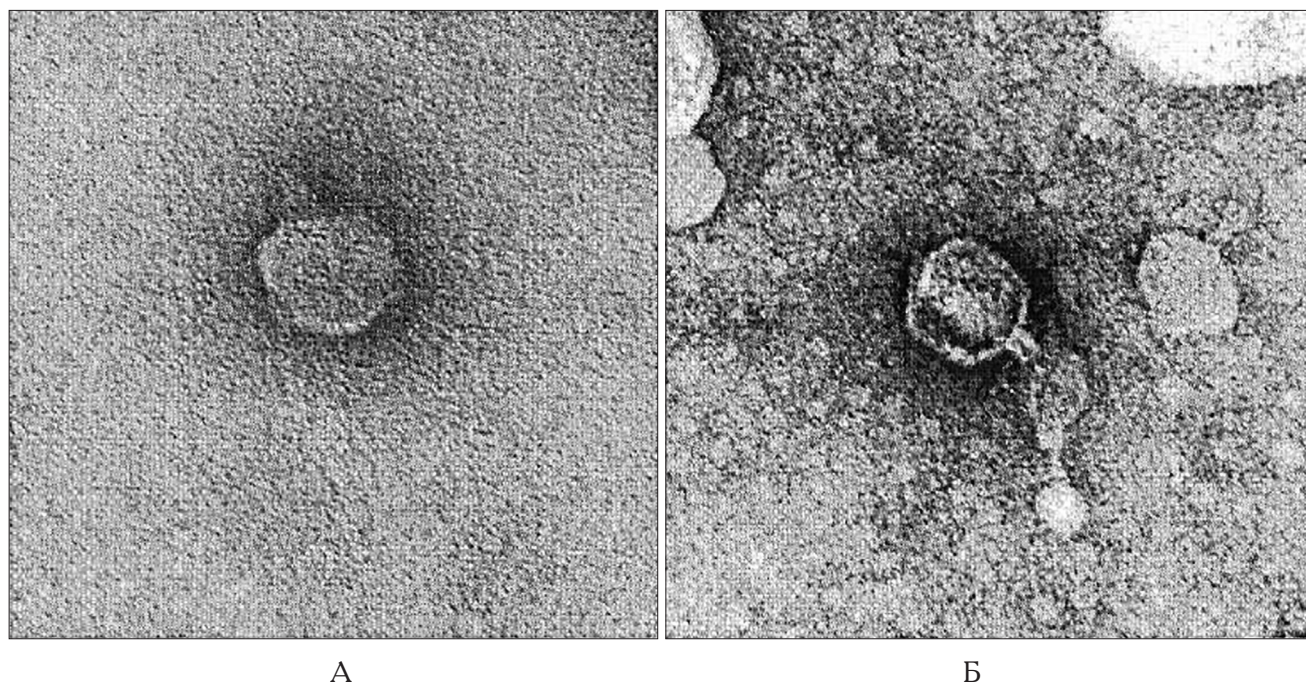
Рис. 1. Морфология холерных бактериофагов Rostov-1 (А) и Rostov-6 (Б) (увеличение $\times 150000$)

Таблица 1

Хвостатые фаги, обнаруженные в базе данных Genbank (NCBI)

№	Название	Номер доступа в Genbank (NCBI)
1	<i>Vibrio phage vBVc hm-138</i>	JQ177064.1
2	<i>Vibrio phage N4</i>	FJ409640.1
3	<i>Vibrio phage ICP3 2007 A</i>	HQ641344.1
4	<i>Vibrio phage ICP3</i>	HQ641340.1
5	<i>Vibrio phage ICP3 2008 A</i>	HQ641343.1
6	<i>Vibrio phage ICP3 2009 B</i>	HQ641341.1
7	<i>Vibrio phage VP4</i>	DQ029335.1

Геном фага Rostov-1 состоит из 37247 т.п.н., в нем 39 генов идентифицировано. Путем сравнения с имеющимися в базе генами других фагов из группы *Vibrio phage* обнаружено 23 последовательности с установленными функциями, что составляет 58,97% от общего количества, и 16 последовательностей с не установленными функциями — 41,03%. Гомологичные последовательности в известных бактериальных геномах не найдены.

После анализа данных, предоставленных системой blastn, был обнаружен бактериофаг, гомологичный нашему Rostov-1, под названием N4 с 98% перекрытием генов и идентичный на 99% из группы *Vibrio phage*. Бактериофаг N4 имеет наибольшее сходство по нуклеотидной структуре и размеру генома (рис. 2).

В геноме обнаружено много общих генов как с установленными, так и с не установленными функциями. Так же, как и *Vibrio phage Rostov-1, N4* был выделен из сточных вод, организмом-хозяином является *V. cholerae O1 El Tor*, а также он описан как литический. Возможно, один из них является мутантом другого (рис. 3). Также фагу Rostov-1 гомологичны еще 17 вирусов.

Геном фага Rostov-6 состоит из 39934 т.п.н., в нем идентифицировано 15 открытых рамок считывания. Путем сравнения с имеющимися в базе генами обнаружено 13 последовательностей, гомологичных бактериальным геномам, что составляет 86,67% от общего, и всего 2 похожи на фаговые — 13,33%, причем не из группы *Vibrio* (*Salmonella phage* и *Bordetella phage*).

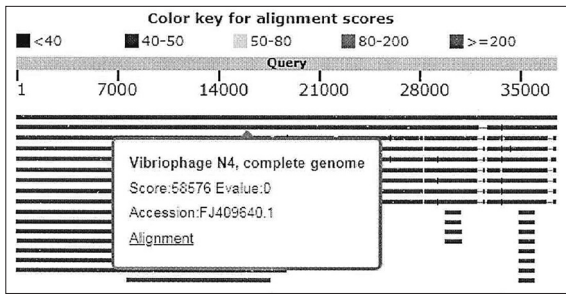


Рис. 2. Выравнивание ORF системой blastn (*Vibrio phage N4*)

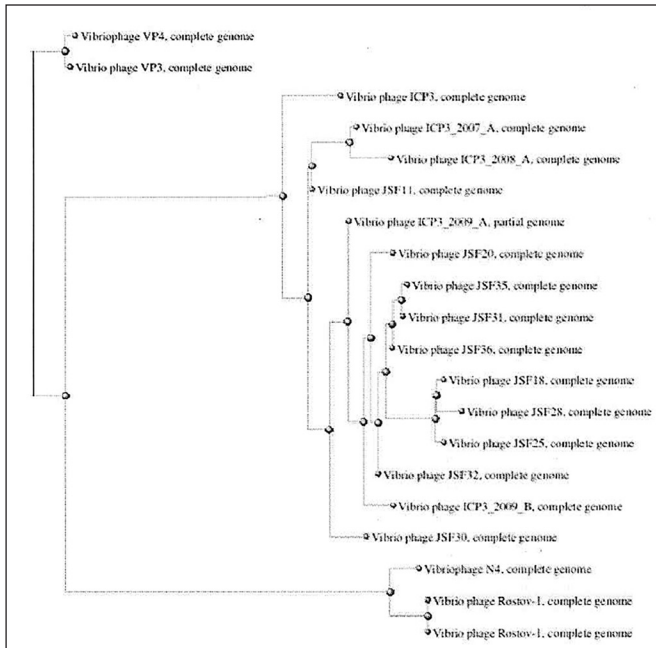


Рис. 3. Дендрограмма, построенная с помощью парных выравниваний BLAST для *Vibrio phage Rostov-1*

Судя по наличию бактериальных генов и интегразы, бактериофаг Rostov-6 является умеренным. В структуре генома обнаружены последовательности не только от бактерий рода *Vibrio*, а также архей и микоплазм, что объясняет его происхождение из водоема. Эти генетические элементы занимают достаточно крупные участки генома.

Ближе всего по нуклеотидной структуре и размеру генома из группы *Vibrio phage* стоит бактериофаг VP2 с номером доступа AY505112.1 и размером генома 39853 т.п.н. (рис. 4). Он идентичен на 96% фагу *Vibrio phage Rostov-6*. Кроме этого, бактериофагу гомологичны еще 13 вирусов из той же группы.

После построения дендрограммы системой BLAST для *Vibrio phage Rostov-6* стало видно, что он стоит достаточно далеко от VP2, и все же это говорит о его обособленном положении в группе *Vibrio phage* (рис. 5).

С помощью биоинформационного анализа нуклеотидных последовательностей в их составе выявлены гены, характерные для головчатых фагов рода *Vibrio*. Исследуемые фаги схожи на 86–99% с геномами, представленными в базе данных Genbank (NCBI).

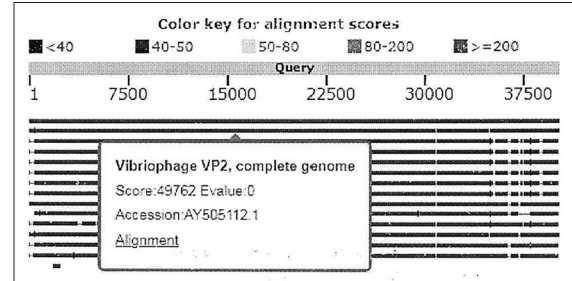


Рис. 4. Выравнивание ORF системой blastn (*Vibrio phage VP2*)

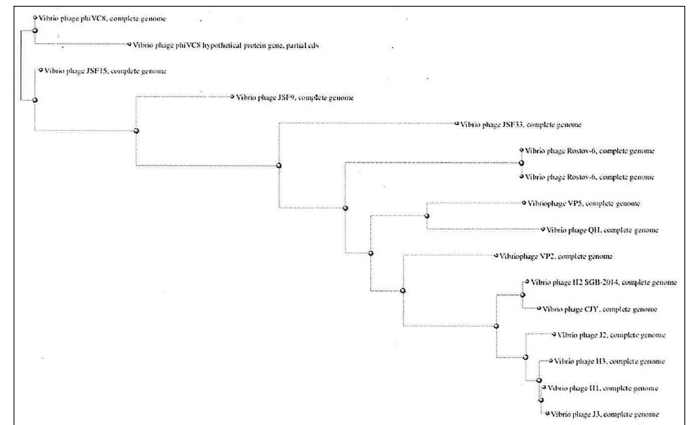


Рис. 5. Дендрограмма, построенная с помощью парных выравниваний BLAST для *Vibrio phage Rostov-6*

Заключение

Таким образом, в работе установлена полная геномная последовательность бактериофагов Rostov-1 и Rostov-6. *Vibrio phage Rostov-1* является литическим и может быть использован для фагодиагностики, а так же, как и компонент лечебно-профилактического препарата. После биоинформационного анализа стало известно, что *Vibrio phage Rostov-6* идентичен на 96% геному *Vibrio phage VP2*, представленному в базе данных Genbank (NCBI). К сожалению, данные об этом фаге не были опубликованы, как и характеристики его морфологии, специфичности, распространенности в составе геномов вибрионов, что затрудняет оценку его значимости. Однако есть публикация по другому сходному фагу phiVC8, который охарактеризован как литический, относящийся к подсемейству VP2-подобных фагов и который является перспективным для использова-

ния в диагностике и фаготерапии холеры [16]. Бактериофаг Rostov-6 можно считать уникальным, так как идентичных ему не было обнаружено. *Vibrio phage* Rostov-6 может быть успешно использован для конструирования диагностических препаратов. Наличие интегразы затрудняет его использование в фаготерапии.

Полные геномные последовательности фагов Rostov-1 и Rostov-6 зарегистрированы и доступны в международной базе Genbank (NCBI) под инвентарными номерами MG957431 и MH105773 соответственно.

Литература

1. Габрилович И.М. Практическое пособие по бактериофагии. — Минск: Вышэйшая школа, 1968.
2. Каттер Э., Сулаквелидзе А. (ред.). Бактериофаги: Биология и практическое применение. Пер. с англ. коллектив переводчиков. Науч. ред. А.В. Летаров. — М.: Научный мир, 2012 (английское издание 2005 г.).
3. Крылов В.Н. Роль горизонтального переноса генов бактериофагами в возникновении патогенных бактерий // Генетика. — 2003. — Т. 39(5). — С. 595–620.
4. Ломов Ю.М., Сомова А.Г., Кудрякова Т.А. Холерные фаги. — Ростов-на-Дону, 1990.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии: Молекулярное клонирование. Пер. с англ. — М.: Мир, 1984.
6. Москвитина Э.А., Тюленева Е.Г., Кругликов В.Д. и др. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2008–2017 гг. Прогноз на 2018 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2018. — № 1. — С. 36–43.
7. Титова С.В., Москвитина Э.А., Монахова Е.В. и др. Современные подходы к мониторингу холеры. Холера и патогенные для человека вибрионы. — 2015. — № 28. — С. 10–16.
8. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. — М., 1968. — 89 с.
9. Ackerman H.W. Bacteriophage taxonomy in 1987 // Microbiol. Sci. — 1987. — Vol. 4(17). — P. 210–218.
10. Adams M.H. Bacteriophages. — Inter science Publishers, New York, N.Y., 1959.
11. Centers for Disease Control and Prevention. 2010. Update: cholera outbreak — Haiti, 2010. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 59: 1473–1479.
12. Colwell R.R. Infectious disease and environment: cholera as a paradigm for waterborne disease // Int. Microbiol. — 2004. — Vol. 7. — P. 285–289.
13. Groth A.C., Calos M.P. Phage integrases: Biology and applications // Journal of Molecular Biology. — 2004. — Vol. 335(3). — P. 667–678.
14. Reidl J., and Klose K.E. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host // FEMS Microbiol. Rev. — 2002. — Vol. 26. — P. 125–139.
15. Solís-Sánchez A., Hernández-Chiñas U., Navarro-Ocaña A., Javier De la Mora, Xicohtencatl-Cortes J., Eslava-Campos C. Genetic characterization of ØVC8 lytic phage for *Vibrio cholerae* O1 // Virology Journal. — 2016. — Vol. 13(1). — P. 47.
16. 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.

DETERMINATION OF THE COMPLETE GENOMIC SEQUENCE OF BACTERIOPHAGES *VIBRIO CHOLERAЕ*

M.N. POGOZHVA, N.E. GAEVSKAYA, R.V. PISANOV, A.S. VODOPYANOV,
L.V. ROMANOVA, S.O. VODOPYANOV, A.V. TYURINA, A.O. KOCHETKOVA, S.N. GOLOVIN

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

The study of the biological and genetic characteristics of bacteriophages of *Vibrio cholerae* is one of the priority areas of research in the field of preventing and eradicating the spread of the disease. In this paper, we report the complete genomic sequence of the bacteriophages Rostov-1 and Rostov-6. Using bioinformatics analysis, they were compared with other known phages published in the Genbank (NCBI) database. *Vibrio phage* Rostov-1 is lytic and can be used for phagodiagnosics, as well as a component of a therapeutic and prophylactic preparation. *Vibrio phage* Rostov-6 has been successfully used in experimental research and development, as well as for the design of diagnostic preparation. The presence of integrase makes it difficult to use in phage therapy. The complete genomic sequences of the phages Rostov-1 and Rostov-6 are registered and available in the international Genbank (NCBI) database under the numbers MG957431 and MH105773, respectively.

Keywords: *Vibrio cholerae*, complete genomic sequence, sequencing, *Podoviridae*, bacteriophages, *Vibrio phage* Rostov-1, *Vibrio phage* Rostov-6.

ПОЛУЧЕНИЕ, ОЧИСТКА, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИОЦИНА *ENTEROCOCCUS FAECIUM*

В.М. БОРЗЕНКОВ*, М.Г. ТЕЙМУРАЗОВ, В.И. СУРОВЦЕВ, В.П. ЛЕВЧУК, Ю.И. ХАТЮШИН

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,
Оболенск, Московская обл.

Бактериоцин — пептид, с молекулярной массой ≈ 5 кДа получен и очищен до электрофоретически чистого состояния с выходом 67% от общей активности в культуральной жидкости. Метод HPLC показал, что бактериоцин состоит из двух компонентов А и В с близкими молекулярными массами. Во всех ранее опубликованных работах выход очищенных бактериоцинов не превышал 6–7%. Авторы полагают, что увеличение выхода связано с тем, что учитывалось не только сходство бактериоцинов с высокомолекулярными белками, но и отличия, связанные с малой молекулярной массой, способностью к гидрофобному взаимодействию при слабощелочных значениях pH и устойчивостью к денатурации. Описанные в работе методы очистки с высоким выходом, вероятно, применимы и для других бактериоцинов вследствие близости их физико-химических свойств.

Ключевые слова: *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, бактериоцин, энтероцин, культуральная жидкость, ионообменная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, формула Скоупса.

Введение

Бактериоцины — амфифильные, секретлируемые некоторыми бактериями пептиды (≈ 2 –7 кДа), обладающие антимикробными свойствами. Наибольшее внимание уделяется бактериоцинам, продуцируемым молочнокислыми бактериями (лактобактериями). Они могут быть использованы в медицинских целях и в пищевой промышленности. Эти бактериоцины уничтожают клетки *L. monocytogenes*, что важно для сохранения пищевых продуктов и предотвращения вспышек листериоза [13].

Известны также бактериоцины, эффективно уничтожающие стафилококки [10]. Они действуют, ингибируя биосинтез клеточных стенок или образуя поры в клеточной стенке чувствительных бактерий. Возможны также оба механизма [5]. Способность таких бактериоцинов к действию по двум механизмам предотвращает развитие устойчивости у чувствительных клеток. Более того, микроорганизмы, устойчивые к действию антибиотиков, неустойчивы по отношению к таким бактериоцинам [8].

В последнее десятилетие интенсивно исследуются лактобактерии из рода *Enterococcus*, в частности, вид

E. faecium. Бактериоцины (энтероцины), секретлируемые ими, действуют на чувствительные клетки в пикограммовых и нанограммовых концентрациях, тогда как у антибиотиков типичный диапазон антибактериальной активности лежит в микрограммовой области. В пищевой промышленности широкое применение для сохранения продуктов нашел низин — бактериоцин из *Streptococcus lactis*. Но в препарате лишь 2,5% самого низина [6]. Одной из причин, по которой электрофоретически чистые бактериоцины не применяются в медицине, является низкий выход и сложность получения этих пептидов (общая активность очищенного продукта составляет всего несколько процентов от общей активности в культуральной жидкости — КЖ). Поэтому очищенные бактериоцины используют в настоящее время только для исследовательских работ — определения первичной структуры, рентгеноструктурного анализа и др.

Цель данной работы — получение электрофоретически чистого бактериоцина, секретлируемого клетками *E. faecium*, с выходом $\approx 70\%$ от общей активности в КЖ методами, пригодными для очистки из других видов.

Материалы и методы

Выращивание штамма-продуцента. Штамм *E. faecium* 1073 (депонирован в музее культур ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии — ГНЦ ПМБ — № 5736) выращивали на питательной MRS-среде, приготовленной специально для лактобактерий. Состав

© 2018 г. Борзенков В.М., Теймуразов М.Г., Суровцев В.И., Левчук В.П., Хатюшин Ю.И.

* Автор для переписки:

Борзенков Валерий Михайлович

к.б.н., ст. н. сотр. Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск

E-mail: vmborzenkov@mail.ru

(г/л): протеозопептон — 10; мясной экстракт — 10; дрожжевой экстракт — 5; глюкоза — 20; твин-80 — 1; цитрат аммония — 2; CH_3COONa — 5; MgSO_4 — 0,1; Na_2HPO_4 — 2; MnSO_4 — 0,05. Конечное значение рН при 25 °С 7,2±0,2. Готовая среда янтарного цвета, прозрачная, слегка опалесцирует, после автоклавирования (0,5 атм, 30 мин) становится коричневой, почти черной.

Культивировали в качалочных колбах объемом 0,75 л, содержащих 0,28 л питательной среды, на термостатируемой качалке при 37 °С, 130 об/мин в течение 24 часов. Культуру готовили следующим образом. Штамм выращивали на питательной MRS-агар среде. Смыв с чашек доводили до 10^9 кл/мл по стандарту мутности и посевной материал добавляли в колбу в соотношении 1 мл посевной взвеси на 100 мл среды культивирования. После окончания ферментации определяли оптическую плотность в КЖ при 590 нм и значение рН.

Выращивание штаммов для определения физико-химических свойств бактериоцинов. Штамм *E. mundii* E-28 (депонирован в музее культур ГНЦ ПМБ № 8398) культивировали так же, как и штамм-продуцент. Штамм *B. subtilis* САВ-2 был получен из ООО «НИИ антибиотиков» (Москва). Он депонирован в музее культур этого учреждения № 4769. Культивировали в колбах объемом 0,75 л, содержащих 0,1 л питательной среды следующего состава (г/л): панкреатический гидролизат рыбной муки — 0,8; глюкоза — 10,0; пептон ферментативный — 8,0; NaCl — 4,0, дрожжевой экстракт — 5,0. рН питательной среды — 7,0–7,2. Питательную среду автоклавировали при 1 атм, 30 мин. Культивирование вели на термостатируемой качалке при 150 об/мин, 37 °С, 24 часа.

Выращивание штамма тест-культуры. Тест-культурой для проверки активности бактериоцинов был штамм *L. monocytogenes* 776 из коллекции культур ГНЦ ПМБ. Культивирование и питательная среда такие же, как и у штаммов *E. mundii* E-28 и *B. subtilis* САВ-2. Все реактивы производства «Химмед», Россия, квалификация ч.д.а. Во всех случаях раствор глюкозы с солью магния и дрожжевым экстрактом стерилизовали отдельно при 0,5 атм, 30 мин.

Определение активности. Активность бактериоцина определяли с использованием тест-культуры *L. monocytogenes*. Супернатант, полученный после удаления клеток или клеточных фрагментов центрифугированием, анализировали в двукратных разведениях. 10 мкл из каждого разведения наносили на чашки Петри со свежеприготовленным газоном тест-культуры. Чашки инкубировали при 37 °С в течение 18–24 ч. За условную

единицу активности принимали максимальное разведение бактериоцина, вызывающее видимое подавление роста клеток тест-культуры.

Очистка бактериоцина. Суспензию культуры, выращенной при рН 7,2–7,3, концентрировали на установке УПЛ-0,6 (г. Кириши) с полыми волокнами, отсекающими макромолекулы с молекулярной массой более 15 кДа. В концентрате и в элюате проверяли активность бактериоцина. Около 90% активности находилось в концентрате. Концентрат центрифугировали при 4500 г в течение 15 мин. Клеточный осадок удаляли. Супернатант доводили 6 н HCl до рН 2,7 при сильном перемешивании и оставляли на 1,5 часа при 4 °С. За это время фрагменты клеточных стенок выпадали, образуя рыхлый осадок. Центрифугировали при 10 000 г, 20 мин. К осадку клеток по каплям добавили 50 мл 50%-ного изопропанола в 0,9%-ном растворе NaCl, а к осадку фрагментов — 50 мл 50%-ного изопропанола в воде. Обе суспензии помещали в холодильник при 4 °С. Через 1,5 часа центрифугировали, как указано ранее. Микроскопические исследования показали, что клетки после такой обработки сохраняли свою целостность. Осадки клеток и фрагментов отбрасывали, изопропанол выпаривали на роторном испарителе при 55 °С, а в супернатантах определяли активность в 1 мл и общую активность. Определяли также активность в концентрате, освобожденном от клеток и фрагментов (кКЖ-кл-фр). К коричневому раствору кКЖ-кл-фр добавляли светло-желтый раствор клеточного супернатанта, доводили значение рН до 5,0 при перемешивании. Супернатант фрагментов отбрасывали. В колонку ХК 16/40 («GE Healthcare», Швеция) вносили 35 мл микрогранулированной КМЦ («GE Healthcare») с емкостью 1 м-экв/г и уравнивали 0,05М ацетатным буфером, рН 5,0. Затем добавляли объединенный раствор кКЖ-кл-фр и клеточного супернатанта. После нанесения колонку промывали уравнивающим буфером до оптической плотности при A_{280} , равной 0,01. Балластные белки удаляли, пропуская через колонку 0,2М фосфатный буфер, рН 7,4. Детекцию осуществляли с помощью хроматографа АКТА prime («GE Healthcare») при A_{280} . Элюцию проводили в градиенте 0–100% в растворе состава: 0,2М фосфатный буфер — тот же буфер с 0,5М NaCl. Активность фракций определяли по лизису клеток тест-штамма *L. monocytogenes*.

Активные фракции объединяли и очищали методом ВЭЖХ с использованием обращенно-фазовой хроматографии на колонке Hyperpack ODS C18, 4,6×250, размер пор 5 мкм («Technokroma», Испания)

с хроматографом АСТА-purifier («GE Healthcare»). Нанесение образца осуществляли без использования инъекционной петли. Хроматографию вели в режиме градиентного элюирования в системе H_2O -ТФУ(0,1%) — ацетонитрил-ТФУ(0,1%). Реактивы были марки ВЭЖХ-градации. Использовали ТФУ производства «Thermo Fisher Scientific» (Англия) и ацетонитрил производства «Panreac» (Испания). Детекцию осуществляли при длине волны 280 нм с автоматической обработкой данных по программе UNICORN 5,31. Используемые методы соответствовали параметрам линейности и дискретности с погрешностью $\pm 3\%$. Пробы из фракций со временем удержания 4,11 и 4,29 мин были активны. Эти фракции объединяли, удаляли ацетонитрил на роторном испарителе, доводили рН до 7,3 и диализовали против 0,02М фосфатного буфера рН 7,3 при комнатной температуре. Буфер меняли дважды за сутки. После проведения диализа определяли активность бактериоцина.

Электрофорез. Для определения молекулярной массы и чистоты бактериоцина использовали SDS-PAGE-электрофорез в 16%-ном полиакриламидном геле без восстанавливающего агента с набором маркеров: соевый ингибитор трипсина (21,5 кДа), рибонуклеаза (13,7 кДа) и инсулин человека (5,7 кДа).

Масс-спектрометрия. Масс-спектрометрические данные очищенного бактериоцина получали на масс-спектрометре Microflex, LRF MALDI-TOF («Bruker Daltonics», Германия). В качестве калибровочного стандарта использовали Peptide Calibration Standard II («Bruker Daltonics»). Образцы вносили в ячейку MSP-чипа (MSP 96, «Bruker Daltonics») и покрывали насыщенным раствором α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в смеси 50% ацетонитрила, 2,5% ТФУ и 47,5% воды (об/об). Обработку спектров проводили с помощью программы Flex Control в линейном режиме, частота азотного лазера 60 Гц, в диапазоне масс 4–13 кДа. Обработку и анализ спектров проводили, используя программу Flex Analysis.

Определение концентрации бактериоцина в начальной КЖ. Для определения концентрации бактериоцина в КЖ использовали формулу 31, применимую для смеси очищенных белков или пептидов. 100 мкл очищенного методом ВЭЖХ бактериоцина разбавляли в 100–400 раз 0,05 М раствором Na_2SO_4 , доведенным 1М H_2SO_4 до рН 4,0. Сульфат натрия применяется для предотвращения адсорбции на стенках кюветы. Далее определяли A_{205} каждого разбавления (в 100, 200, 300, 400 раз). Полученная прямая указывает на отсутствие олигомеров в этих растворах. Разбавленный в 200 раз

раствор имел оптическую плотность, равную 0,24. Учитывая разбавление, процент общей активности в образце и начальный объем находят концентрацию бактериоцина (суммарную концентрацию энтероцинов А и В) в КЖ.

Результаты и обсуждение

Для очистки бактериоцинов в течение многих лет используют методы, характерные для белков, например, осаждение сульфатом аммония. Однако бактериоцины — это не белки, а сравнительно низкомолекулярные пептиды, у которых отсутствует гидрофобное ядро, и методы, применяемые для высокомолекулярных белков, могут приводить к большим потерям активности и низкому выходу. С другой стороны, условия сохранения биологической активности могут быть для них более жесткими, что открывает возможность использования методов, неприемлемых для большинства белков. С целью определить эти методы были проведены испытания активности в различных условиях бактериоцинов, содержащихся в бесклеточной культуральной жидкости *E. faecium* 1073, *E. mundii* E-28, *B. subtilis* САВ-2.

Оказалось, что при концентрировании в 8–10 раз на полых волокнах с полисульфоновой мембраной, отсекающих вещества с молекулярной массой 15 кДа, общая активность при рН 7,3 в концентрате составляет ≈ 90 –100% от активности в КЖ у всех испытанных бактериоцинов, и через мембрану бактериоцины, несмотря на малую молекулярную массу, не проходят. Все они на колонке с сефадексом G-50 выходят со свободным объемом с полным сохранением активности. Их можно диализовать при слабощелочных значениях рН с полным сохранением активности. Бактериоцин из *E. faecium* терял активность после диализа в 0,02М буфере, рН 4,85. Эти данные указывают на то, что в культуральной жидкости в слабощелочных условиях бактериоцины существуют в виде связанных между собой молекул. Ранее было установлено, что большие катионные ионы, у которых гидрофобные группы соединены с заряженными (в данном случае бактериоцины с изоточками в области рН 8–9), образуют гидрофобно связанные ассоциаты, преодолевая одноименный молекулярный заряд [2]. Значение при такой ассоциации может доходить до -42 кДж/моль, что характерно для фермент-субстратного взаимодействия, также в значительной степени гидрофобного. При понижении рН положительный заряд растет, равновесие в системе мономер — димер — ассоциат сдвигается влево и при кислых значениях рН бактериоцин *E. faecium* выходит из диализного мешка.

Все испытанные малоочищенные бактериоцины термостабильны и полностью сохраняют активность при 80 °С в течение 35 мин, выдерживании в сухожаровом шкафу при 105 °С и кипячении — 15 мин. При добавлении в раствор активированного угля с концентрацией 1 мг/мл и последующем выдерживании в течение часа общая активность уменьшается на 10–15%. Активность полностью сохраняется при доведении раствора до рН 2,5 и выдерживании при этом значении рН в течение нескольких часов. В смесях (50–60%) низкокипящих органических растворителей (н-пентане, изопропанол, трет-бутанол, ацетонитрил, этанол) с водой и последующим их выпариванием и добавлением нейтрального буферного раствора активность бактериоцина полностью восстанавливается.

Эти данные указывают на то, что лучшей стратегией при очистке, позволяющей получить электрофоретически чистый бактериоцин с высоким выходом, по-видимому, является сочетание методов, применяющихся при очистке белков, с методами, используемыми при очистке низкомолекулярных органических соединений. Как пример большой потери активности (на 50% и более), укажем на высаливание бактериоцина из культуральной жидкости сульфатом аммония — метод, который применяется на первой стадии очистки во многих работах. Известно, что при этом методе для хорошего выхода ($\approx 90\%$) нужна концентрация белка ≈ 1 мг/мл [3]. Ранее было показано, что концентрация бактериоцина в культуральной жидкости *B. subtilis* составляет 35–40 мг/л. Если это — типичная концентрация для бактериоцинов, то низкий выход не удивителен даже при 70–75% насыщения, поскольку концентрация балластных белков, с которыми мог бы соосаждаться бактериоцин, составляет 50–60 мг/л [4]. В опытах с бесклеточной КЖ штамма *E. faecium* начальный объем культуральной жидкости был уменьшен в ≈ 50 раз концентрированием на полых волокнах с последующим упариванием на роторном испарителе. После высаливания сульфатом аммония 70%-ного насыщения и диализа общая активность составила 90–95% от активности в КЖ.

Бактериоцины могут находиться на гидрофобной поверхности клеток продуцента, фрагментах клеточных стенок, осаждаемых при кислых значениях рН и в самой культуральной жидкости. Используя клетки и фрагменты как носители, бактериоцины выделяют с их поверхности «гидрофобной» хроматографией (50%-ным изопропанолом). После промежуточных этапов выпаривания и

диализа используют методы, применяемые для очистки белков, — ионообменную и гидрофобную хроматографии [4].

Определенное значение при очистке играет состав питательной среды и способ ее стерилизации. В ней могут содержаться как аминокислоты (или их остатки, входящие в пептиды), так и сахара. При температуре 121 °С в автоклаве (давление 1 атм) и даже 110 °С (давление 0,5 атм) нуклеофильные NH_2 -группы аминокислот быстро взаимодействуют с сахарами (реакция неферментативного потемнения Майяра [11]) с образованием как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных продуктов. Низкомолекулярные продукты могут быть удалены диализом, а высокомолекулярные — на других стадиях (в настоящей работе ионообменной хроматографией и ВЭЖХ). Возможно, лучше избежать образования этих балластных веществ, используя холодную стерилизацию, при которой реакция Майяра идет с очень малой скоростью. Результаты очистки представлены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика бактериоцина *E. faecium* на различных стадиях очистки

Образец	Объем, мл	Удельная активность, у.е./мл	Общая активность, у.е.	Процент общей активности в КЖ
Начальная КЖ	1100	1600	176×10^4	100
кКЖ	193	8192	1581000	90
кКЖ-кл-фр	183	8192	1499000	85
Клетки	25,0	4096	102400	6
Фрагменты	30,0	2048	61440	3
Элюат ИОХ	55	24576	1351680	77
Элюат ВЭЖХ	24	49152	1179648	67

Как видно из таблицы 1, после концентрирования начальной КЖ общая активность снижалась на 10%. Основная часть балластных белков была удалена ионообменной хроматографией. Активные фракции объединяли и наносили на колонку с обратно-фазовой ВЭЖХ. Две фракции со временем удержания 4,11 и 4,29 мин проявили бактерицидную активность по отношению к клеткам *L. monocytogenes* (рис. 1).

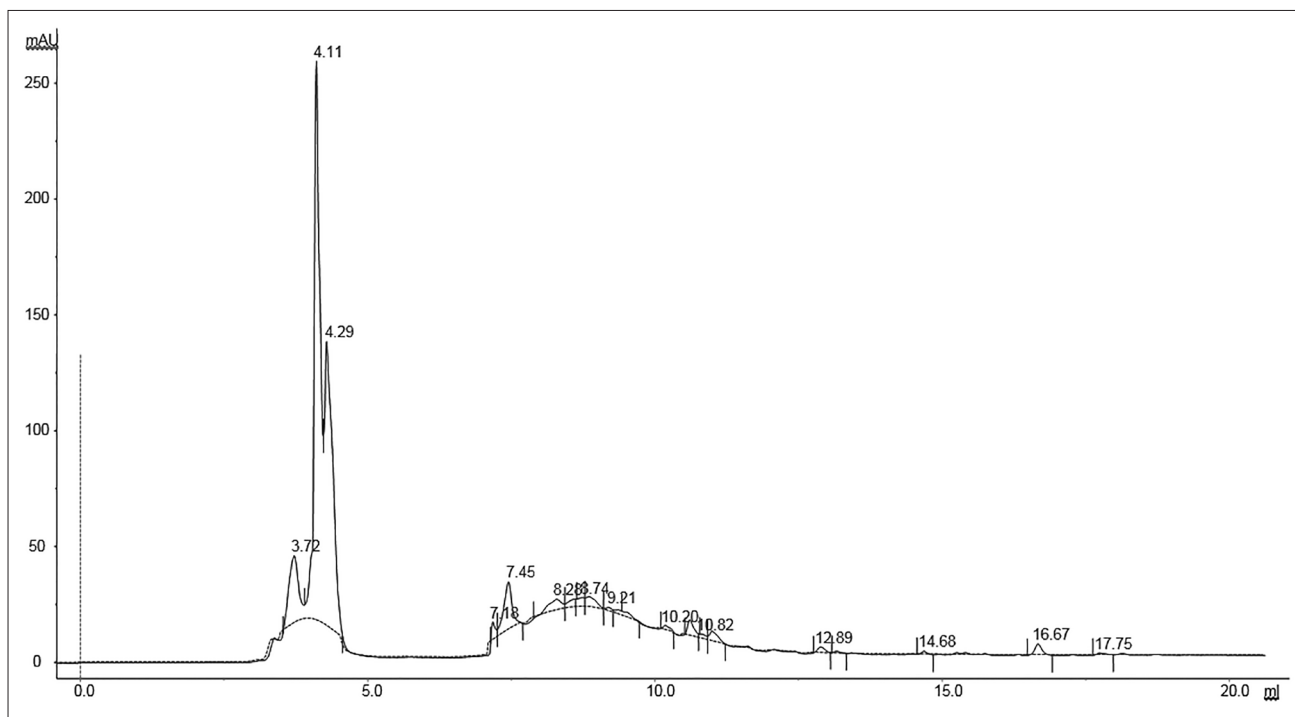


Рис. 1. Обращенно-фазовая хроматография образца бактериоцина *E. faecium* 1073 (активная фракция после ионо-обменной хроматографии) на колонке Нунерграк ODS 5 мк С18 4,6×250. Энтероцин А — пик со временем удержания 4,11 мин. Энтероцин В — пик со временем удержания 4,29 мин

Электрофорез в ПААГ показал наличие единственного пятна с молекулярной массой ~ 5 кДа (рис. 2).

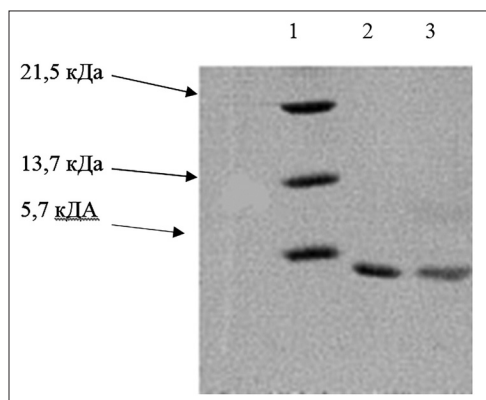


Рис. 2. Электрофореграмма очищенного бактериоцина: 1 — белки-маркеры; 2 — 1 мкг бактериоцина в пробе; 3 — 0,7 мкг бактериоцина в пробе

Однако масс-спектрометрические данные свидетельствуют о наличии двух пиков с молекулярными массами, совпадающими молекулярными массами энтероцинов А и В, выведенными из первичной структуры [9, 12] (рис. 3).

Показано, что минорный энтероцин синергически усиливает биологическое действие другого энтероцина [7]. Возможно, наличие одного пятна в электрофореграмме объясняется малым содержанием минорного

компонента в КЖ и близостью молекулярных масс энтероцинов.

Для оценки концентрации бактериоцина в КЖ использовали формулу Скоупса: $=27+120 \times (A_{280}/A_{205})$ [14]. Эта формула, предложенная для белков, была впоследствии применена для бактериоцинов [4] и других пептидов [1]. Второй член суммы с правой стороны равен ≈ 4 и таким образом $31 \pm 10\%$ [3]. При 205 нм поглощают не только тирозин и триптофан, но еще, по крайней мере, 4 аминокислоты, так что в расчете на 1 мг/мл формула Скоупса дает примерно одинаковые результаты для почти любого белка и пептида. В оригинальной работе были использованы 12 белков различной молекулярной массы и разной структуры. Таким образом, формула может быть применена не только для одного очищенного белка, но и для их смеси. Чувствительность метода в 100 раз выше, чем для методов, использующих поглощение при 280 нм. Многие вещества мешают определению, но при таком разбавлении их действие становится несущественным. Метод не требует, в отличие от методов, основанных на поглощении тирозина и триптофана, наличия ароматических остатков. В настоящей работе эта формула, в ее приближенном виде, была использована для оценки суммарной концентрации энтероцинов А и В в КЖ. Эта концентрация оказалась равной 34 ± 4 мг/л.

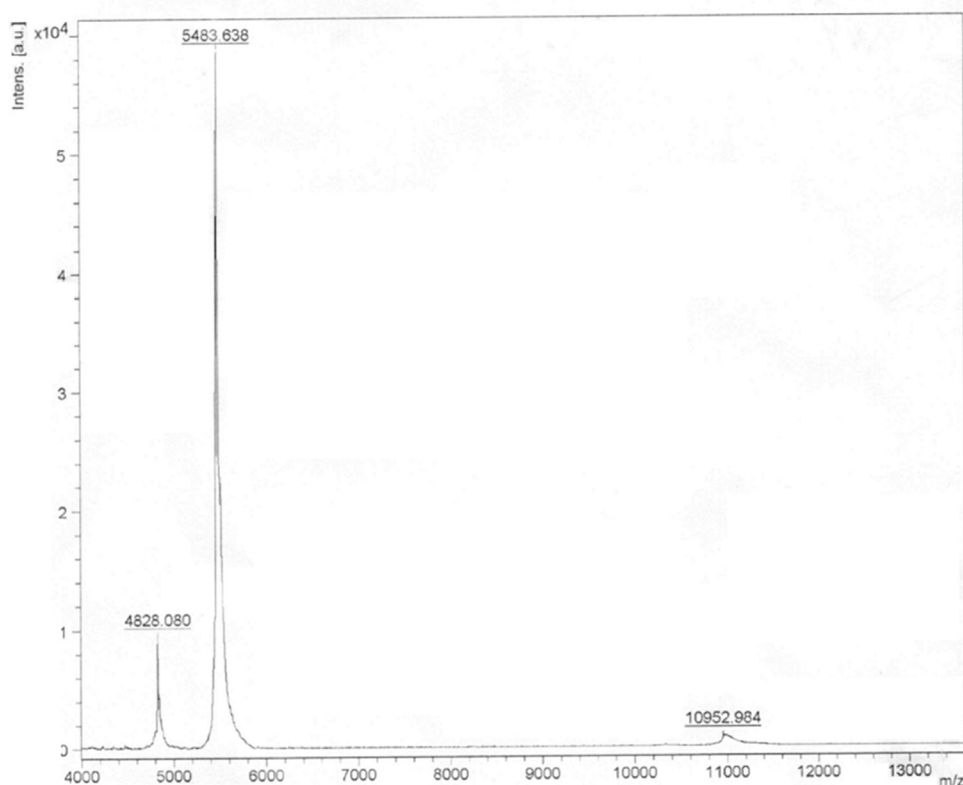


Рис. 3. Масс-спектрограмма бактериоцина *E. faecium* 1073. Энтероцин А — пик с молекулярной массой 4828 кДа; энтероцин В — пик с молекулярной массой 5483 кДа

Заключение

Можно полагать, что методы очистки, применяемые в настоящей работе, могут быть использованы для получения электрофоретически чистых бактериоцинов с высоким выходом и для других продуцентов, вследствие близости их физико-химических свойств.

Литература

1. Григорашвили Е.И., Селиванова О.М., Довидченко Н.В., Джус У.Ф., Михайлина А.О., Суворина М.Ю., Марченков В.В., Сурин А.К., Галзитская О.В. Определение размера ядер сворачивания фибрилл, образованных рекомбинантным пептидом A β (1–40) // Биохимия. — 2016. — Т. 81. — № 5. — Р. 710–720.
2. Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. — М.: «Изд-во Мир», 1972. — 304 с.
3. Скоулс Р. Методы очистки белков. — М.: «Изд-во Мир», 1985. — 314 с.
4. Суровцев В.И., Борзенков В.М., Левчук В.П. Очистка бактериоцинов хроматографическими методами // Биотехнология. — 2014. — Т. 30. — № 5. — С. 44–49.
5. Bierbaum G., Sahl H.G. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering // Curr. Pharm. Biotechnol. — 2009. — Vol. 10(1). — Р. 2–18.
6. Bilkova A., Sepova H.K., Bilka F., Balazova A. [Bacteriocins produced by lactic acid bacteria] // Ceska Slov. Farm. — 2011. — Vol. 60(2). — Р. 65–72.
7. Casaus P., Nilsen T., Cintas L.M., Nes I.F., Hernandez P.E., Holo H. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A // Microbiol. — 1997. — Vol. 143(Pt. 7). — Р. 2287–2294.
8. Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food // Nat. Rev. Microbiol. — 2005. — Vol. 3(10). — Р. 777–788.
9. Franz C.M.A.P., Worobo R.W., Quadri L.E.N., Schillinger U., Holzapfel W.H., Vederas J.C., Stiles M.E. Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900 // Appl. Environ. Microbiol. — 1999. — Vol. 65(5). — Р. 2170–2178.
10. Götz F., Perconti S., Popella P., Werner R., Schlag M. Epidermin and gallidermin: Staphylococcal lantibiotics // Int. J. Med. Microbiol. — 2014. — Vol. 304(1). — Р. 63–71.
11. Hodge J.E. Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems // J. Agric. Food Chem. — 1953. — Vol. 1(15). — Р. 928–943.
12. O’Keeffe T., Hill C., Ross R.P. Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium*

- DPC1146 // Appl. Environ. Microbiol. — 1999. — Vol. 65(4). — P. 1506–1515.
13. Ramaswamy V., Cresence V.M, Rejitha J.S, Lekshmi M.U, Dharasana K.S, Prasad S.P and Vijila M.H. Listeria — review of epidemiology and pathogenesis // J. Microbiol., Immunol. Infect. — 2007. — Vol. 40(1). — P. 4–13.
14. Scoups R.K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm // Anal. Biochem. — 1974. — Vol. 59(1). — P. 277–282.

Список сокращений:

КЖ — культуральная жидкость;

MRS — среда (среда de Man-Rogosa-Sharpe);

кл/мл — клеток в мл;

кКЖ — концентрат КЖ;

об/мин — обороты в минуту;

кКЖ-кл-фр — концентрат КЖ без клеток и фрагментов;

ИОХ — ионообменная хроматография;

ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография;

у.е./мл — условные единицы в 1 мл;

ΔG — изменение свободной энергии Гиббса;

м-экв — миллиэквивалент;

ТФУ — трифторуксусная кислота.

OBTAINING, PURIFICATION, PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF THE BACTERIOCIN *ENTEROCOCCUS FAECIUM*

V.M. BORZENKOV, M.G. TEIMURAZOV, V.I. SUROVTSEV, V.P. LEVCHUK, Y.I. HATYUSHIN

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region

Bacteriocin is a peptide with a molecular weight of ≈ 5 kDa obtained and purified to an electrophoretic state with a yield of 67% of the total activity in the culture liquid. The HPLC method showed that bacteriocin consists from two components A and B with similar molecular masses. In all previously published works, the yield of purified bacteriocins did not exceed 6–7%. The authors believe that the increase of yield is due to the fact that not only the similarity of bacteriocins with high-molecular proteins was taken into account, but also the differences associated with low molecular weight, ability to hydrophobic interaction at weakly alkaline pH values and resistance to denaturation. The high-yield purification methods described in this paper are probably to be applicable to other bacteriocins due to the proximity of their physico-chemical properties.

Keywords: *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, bacteriocin, enterocin, culture liquid, ion exchange chromatography, high performance liquid chromatography, Scoups formula.

ПРИМЕНЕНИЕ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СЫРЬЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ – РОДИОЛЫ ЧЕТЫРЕХРАЗДЕЛЬНОЙ

А.Ю. СТЕПАНОВА*, Е.А. ГЛАДКОВ, А.И. СОЛОВЬЕВА

ФГБУН «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН», Москва

В статье рассмотрено использование родиолы четырехраздельной (родиолы холодной, красной щетки) как лекарственного растения и биотехнологический метод получения ее корневой культуры. В работе были использованы две основные схемы агробактериальной трансформации. Наиболее успешной оказалась технология, при которой проводилась только инкубация растительного материала в суспензии агробактерии в течение 12 ч без дальнейшего культивирования на среде с агробактерией. В результате были получены экспланты с корневой культурой (*hairy roots*). Таким образом, разработана технология получения корневой культуры родиолы четырехраздельной и подобраны условия ее культивирования.

Ключевые слова: *Rhodiola quadrifida*, лекарственное растение, *hairy roots*, биотехнологический метод получения корневой культуры.

Родиола четырехраздельная (*Rhodiola quadrifida*) является ценным лекарственным растением. Препараты на ее основе улучшают память, способность к обучению, используются в качестве тонизирующих средств, в лечении гинекологических заболеваний, а также наружно — для лечения ожогов и ушибов. Использование этого лекарственного растения усложняется тем, что оно относится к редким видам; поэтому для получения ее биомассы необходимо привлекать биотехнологические подходы. Известно, что основные действующие вещества представителей рода *Rhodiola* (циннамилгликозиды и салидрозид) содержатся в подземной части. Следовательно, наращивание биомассы в виде корневой культуры (*hairy roots*) является более перспективным, чем выращивание недифференцированных клеток.

Род *Rhodiola* (*Crassulaceae*) включает в себя около 90 видов [9]. Многие представители этого рода произрастают в Тибете, Китае и Монголии и традиционно используются в качестве тонизирующих, адаптогенных, антидепрессантных и противовоспалительных препаратов. Исследования фармакологических свойств родиолы были начаты в 1960 году в Скандинавии и СССР. Одна-

ко глобальное (интенсивное) изучение свойств родиолы началось с 2000 года. Наиболее известным видом является *Rhodiola rosea* (*R. rosea*) (родиола розовая, золотой корень), который теперь культивируется также в Европе и Северной Америке. В настоящее время показано, что родиола обладает широким спектром фармакологического действия на организм человека, в том числе оказывает влияние на центральную нервную систему: улучшает внимание, память, обучение. Основными действующими веществами родиолы являются фенольный спирт тирозол, его глюкозид — салидрозид и фенилпропаноид розавин (рис. 1) [1, 6, 7].

Родиола четырехраздельная (родиола холодная, красная щетка) (*Rhodiola quadrifida*) принадлежит к тому же семейству, но менее известна в Европе [19]. Она является ценным лекарственным растением. В отличие от родиолы розовой, она менее изучена, однако экстракты из корней и корневищ родиолы четырехраздельной также обладают широким спектром действия и используются в традиционной китайской медицине в качестве кровоостанавливающего, противокашлевого и тонизирующего средства, в лечении гинекологических заболеваний. Родиола холодная повышает физическую выносливость, улучшает память, способность к обучению, ее также можно применять наружно — для лечения ожогов и ушибов [8, 10, 15, 21].

Использование *R. quadrifida* как лекарственного растения усложняется тем, что она является редким растением и растет крайне медленно.

© 2018 г. Степанова А.Ю., Гладков Е.А., Соловьева А.И.

* Автор для переписки:

Степанова Анна Юрьевна

канд. биол. наук, зав. группой специализированного метаболизма корней ФГБУН «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН», Москва

E-mail: step_ann@mail.ru

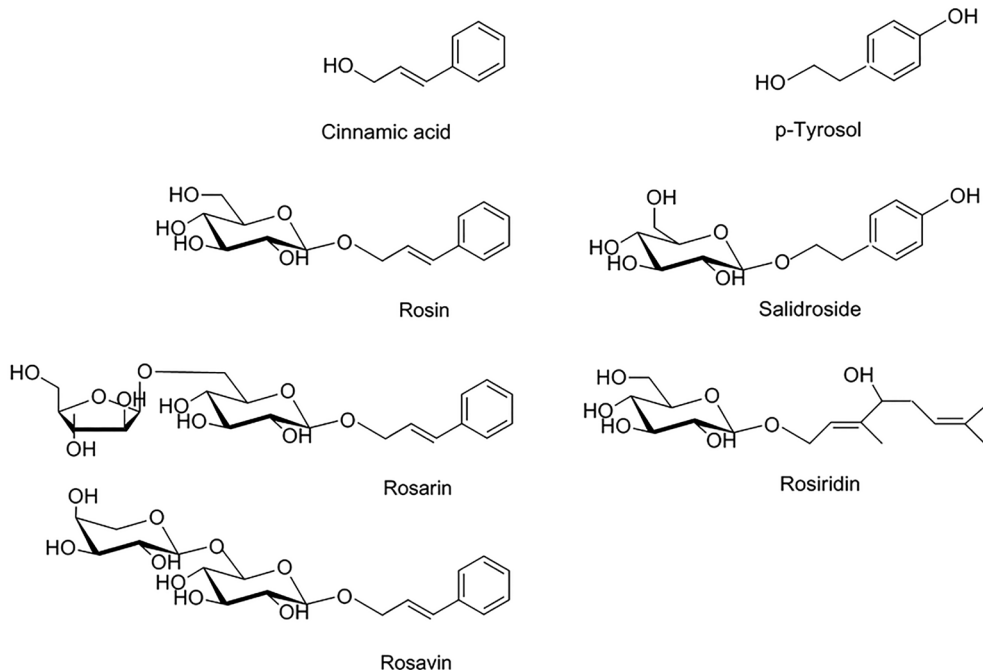


Рис. 1. Основные действующие вещества представителей *Rodiola* spp.

Родиола четырехраздельная внесена в красные книги ряда субъектов Российской Федерации: Забайкальского края [2], Республик Коми и Алтай [3, 4], была указана в Красной книге Пермской, Свердловской областей [5] и во многих других регионах. Учитывая редкость данного растения, привлечение биотехнологических подходов для получения ее сырья является целесообразным. В условиях *in vitro* растительную биомассу возможно наращивать в виде дифференцированных, например, корневых культур (*hairy roots*) и недифференцированных культур (суспензий и каллусов). Известно, что основные действующие вещества представителей рода *Rhodiola* (циннамилгликозиды и салидрозид) содержатся в подземной части; следовательно, наращивание биомассы в виде корневой культуры (*hairy roots*) является более перспективным, чем в виде недифференцированных клеток. Кроме этого, корневые культуры имеют определенные преимущества по сравнению с недифференцированными культурами: они генетически стабильны, быстрее растут и проявляют высокую биосинтетическую активность; поэтому целью настоящей работы стало получение *hairy roots* родиолы четырехраздельной.

Материалы и методы

В качестве объекта исследований использовали родиолу четырехраздельную (*Rhodiola quadrifida*). Для получения асептического материала ее семена по-

мещали в 70% этиловый спирт на 30 с, затем перенесли в раствор коммерческого отбеливателя «Белизна» (7–9% активного хлора) на 30 минут, после чего их 3 раза промывали стерильной дистиллированной водой. Стерильные семена проращивали на среде по Гамборгу (B₅) (содержание основных веществ мг/л: KNO₃ – 2500, CaCl₂×2H₂O – 150, MgSO₄×7H₂O – 250, (NH₄)₂SO₄ – 134, NaH₂PO₄×H₂O – 150, KI – 0,75, H₃BO₃ – 3,0, MnSO₄×H₂O – 10, ZnSO₄×7H₂O – 2,0, Na₂MoO₄×2H₂O – 0,25, CuSO₄×5H₂O – 0,025, CoCl₂×6H₂O – 0,025, Fe-хелат – 43, мезо-инозит – 100, никотиновая кислота – 1,0, пиридоксин-HCl – 1,0, тиамин-HCl – 10, сахараза – 2%, pH 5,5) [12].

Штамм *Agrobacterium rhizogenes* 15834

Для трансформации использовали дикий, немодифицированный штамм *Agrobacterium rhizogenes* 15834. Штамм 15834 выращивали на агаризованной питательной среде YEB [20]. Перед трансформацией суспензионную культуру агробактерии наращивали в течение 24 часов при +23 °C на качалке с круговым вращением (амплитуда 5–10 см, скорость вращения 90 об/мин.).

Трансформация растительного материала

Для получения *hairy roots* родиолы четырехраздельной использовали инкубацию эксплантов (гипокотыля и листьев) ювенильных проростков в суспензии агробактерии на среде B₅. Продолжительность совместной инкубации эксплантов с агробактерией составляла 12 часов, после чего их пересаживали на ту же среду, но с

антибиотиком цефотаксимом в концентрации 500 мг/л («Клафоран», Великобритания). Последующую пересадку на свежую среду проводили по мере зарастания агробактерией. Через 14 дней наблюдали ризогенез на отдельных эксплантах.

Результаты и обсуждение

В настоящее время возрастает спрос на лекарственные растения, в том числе и на представителей рода *Rhodiola*, поскольку они имеют широкий спектр фармакологического воздействия на организм человека. Однако среди представителей рода *Rhodiola* в биотехнологических исследованиях используются *R. rosea*, *R. kirilowii*, *R. sachalinensis*, *R. renulata*, *R. imbricata*, из которых получены разные типы культур *in vitro* и показано содержание в них активных компонентов [11, 13, 14, 18, 22]. Существует небольшое число работ по получению *hairy roots* [16, 23].

Получение *hairy roots* родиолы четырехраздельной было осуществлено впервые, среди доступных публикаций есть только одна статья, посвященная получению и анализу только калусной культуры данного вида родиолы [17]. Возможно, это связано с редкой встречаемостью самого растения и трудностью введения в культуру *in vitro*. Однако, поскольку действующие вещества родиолы находятся в корнях, целесообразнее получение *hairy roots*.

В нашей работе были использованы две основные схемы агробактериальной трансформации (рис. 2). В первом варианте гипокотили и семядоли помещали на газон агробактерии на 24–48 часов, затем пересаживали на среду В5 с цефотаксимом (500 мг/л). Однако в данном случае появление корней не наблюдалось, в связи с интенсивным ростом бактерии. Сокращение или удлинение продолжительности взаимодействия с агробактерией не приводило к положительному результату (рис. 2А). Второй вариант предусматривал совместную инкубацию эксплантов (гипокотилей и семядолей) в суспензии агробактерии в течение 12–24 часов (рис. 2В). По этой схеме было обработано 30 семядолей, но не было получено корней, поскольку наблюдалось интенсивное заражение агробактерией. В случае применения схемы, при которой проводилась только инкубация в суспензии агробактерии в течение 12 часов без дальнейшего культивирования на среде с агробактерией, были получены экспланты с корнями. По этой схеме было обработано 25 эксплантов (10 семядолей и 15 гипокотилей) и получено 4 экспланта с корнями.

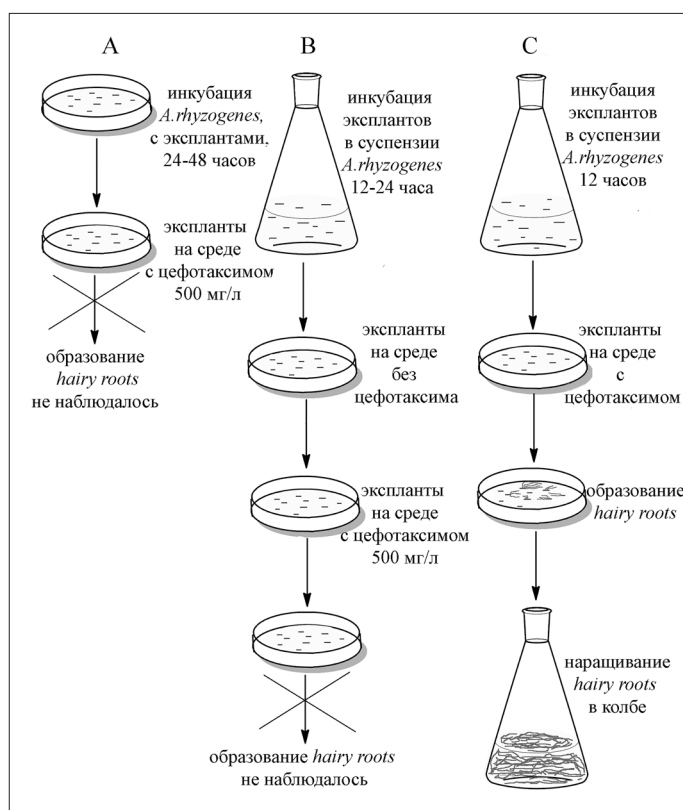


Рис. 2. Схема агробактериальной трансформации

Корни вместе с эксплантом были осторожно перенесены в колбу на 100 мл с содержанием среды — 20 мл (цефотаксим — 500 мг/л), затем их культивировали в течение месяца (рис. 2С). После этого растущие корни отделяли от экспланта и пересаживали в те же колбы, увеличивая объем среды до 40 мл и понижая концентрацию антибиотика до 250 мг/л (рис. 3).

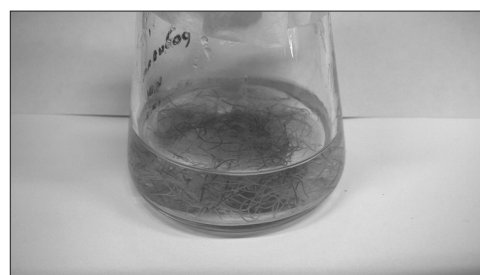


Рис. 3. Культура *hairy roots* родиолы холодной

Пересадку на свежую питательную среду проводили каждые 4 недели, постепенно снижая дозу цефотаксима. После полугодия культивирования корни переводили на среду без цефотаксима.

После стабилизации роста стали применять следующую схему культивирования: 2 недели — в колбах на 100 мл с объемом среды 40 мл и 3 недели — в колбах на 300 мл с объемом среды 250 мл (рис. 4).

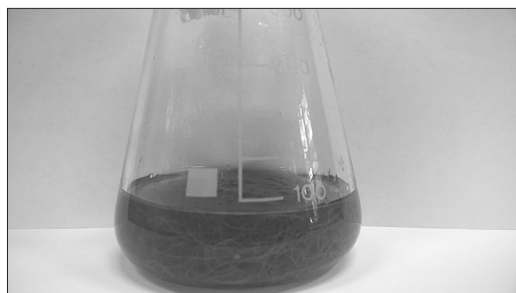


Рис. 4. Культура *hairy roots* родиолы четырехраздельной к концу цикла культивирования

Рост корней оценивали по универсальному показателю — индекс роста. Было показано, что к концу цикла культивирования индекс роста составлял 19,8, то есть культура является быстро растущей, что указывает на то, что мы получили именно *hairy roots*.

Заключение

Таким образом, нами впервые была получена корневая культура родиолы четырехраздельной и подобраны условия ее культивирования.

Литература

1. Аксенова Р.А. К фармакологии родиолозида. дис. ... канд. биол. наук. — Томск, 1968. — С. 90–93.
2. Красная книга Забайкальского края: Растения / ред. коллегия О.А. Поляков, О.А. Попова, О.М. Афонина и др. — Новосибирск: Дом мира, 2017. — 384 с.
3. Красная книга Республики Алтай, растения. — Горно-Алтайск, 2017. — 272 с.
4. Красная книга Республики Коми / под ред. А.И. Таскаева. — Сыктывкар: Ин-т биологии Коми НЦ УрО РАН, 2009. — 791 с.
5. Красная книга Среднего Урала (Свердловская и Пермская области): Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды животных и растений. — Екатеринбург, 1996.
6. Крендаль Ф.П., Козин С.В., Левина Л.В. Сравнительная характеристика препаратов из группы фитоадаптогенов — женьшеня, элеутерококка и родиолы розовой. — М.: Профиль, 2007. — 392 с.
7. Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям. — М.: Медицина. 1984. — 464 с.
8. Altantsetseg K., Przybyl J., Węglarz Z., Geszprych A. Content of biologically active compounds in roseroot (*Rhodiola* sp.) raw material of different derivation // *Herba polonica*. — 2007. — Vol. 53. — P. 20–26.
9. Booker A., Zhai L., Gkouva C., Li S., Heinrich M. From traditional resource to global commodities: A comparison of *Rhodiola* species using NMR spectroscopy-metabolomics

and HPTLC // *Front Pharmacol.* — 2016. — Vol. 7. — P. 254. doi: 10.3389/fphar.2016.00254.

10. Chiang H.M., Chen H.C., Wu C.S., Wu P.Y., Wen K.C. *Rhodiola* plants: Chemistry and biological activity // *Journal of Food and Drug Analysis*. — 2015. — Vol. 23. — P. 359–369.
11. Furmanowa M., Hartwich M., Alfermann A.W., Kozminski W., Olejnik M. Rosavin as a product of glycosylation by *Rhodiola rosea* (roseroot) cell cultures // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* — 1999. — Vol. 56. — P. 105–110.
12. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima O. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp. Cell Res.* — 1968. — Vol. 50(1). — P. 151–158.
13. György Z. Glucoside production by in vitro *Rhodiola rosea* cultures. Dissertation, Acta Universitatis Ouluensis C Technica. — Oulu, 2006. — 244 p.
14. Krajewska-Patan A., Dreger M., Buchwald W., Gorska-Paukszt M., Mielcarek S., Baraniak M., Mscisz A., Furmanowa M., Mrozikiewicz P.M. Callus tissues of *Rhodiola kirilowii* (Regel) Maxim. — dynamics of growth and active compounds production // *Herba Pol.* — 2009. — Vol. 55(3). — P. 222–230.
15. Kędzia B., Furmanowa M., Krajewska-Patan A., Hołderna-Kędzia H., Mścisz A., Wójcik J., Buchwald W., Mrozikiewicz P.M. Badania nadtoksycznością oraz działaniem adaptogennym i przeciwdrobnoustrojowym wyciągów otrzymanych z podziemnych części wybranych gatunków *Rhodiola* L. // *Herba Polonica*. — 2006. — Vol. 52. — P. 117–132.
16. Lan X., Chang K., Zeng L., Liu X., Qiu F., Zheng W., Quan H., Liao Z., Chen M., Huang W., Liu W., Wang Q. Engineering salidroside biosynthetic pathway in hairy root cultures of *Rhodiola crenulata* based on metabolic characterization of tyrosine decarboxylase // *PLoS One*. — 2013. — Vol. 8(10). — e75459. doi: 10.1371/journal.pone.0075459.
17. Sheng C.Z., Hu T.Q., Bi H., Yuan Y.J., Jiang Y. Effects of plant growth substances on induction and culture of callus from *Rhodiola quadrifida* // *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. — 2005. — Vol. 30(16). — P. 1237–1240.
18. Shi L, Wang C, Zhou X, Zhang Y, Liu Y, Ma C. Production of salidroside and tyrosol in cell suspension cultures of *Rhodiola crenulata* // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* — 2013. — Vol. 114. — P. 295–303.
19. Skopińska-Rózewska E., Malinowski M., Wasiutyński A., Sommer E., Furmanowa M., Mazurkiewicz M., Siwicki A.K. The influence of *Rhodiola quadrifida* 50% hydro-alcoholic extract and salidroside on tumor-induced angiogenesis in mice // *Pol. J. Vet. Sci.* — 2008. — Vol. 11(2). — P. 97–104.
20. Vervliet G, Holsters M., Teuchy H., Van Montagu M., Shell J. Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strains // *J. Gen. Virol.* — 1975. — Vol. 26(1). — P. 33–48.

21. Wiedenfeld H., Duma M., Malinowski M., Furmanowa M., Narantuya S. Phytochemical and analytical studies of extracts from *Rhodiola rosea* and *Rhodiola quadrifida* // Pharmazie. – 2007. – Vol. 62. – P. 308–311.
22. Xu J.F., Ying P.Q., Han A.M., Su Z.G. Enhanced salidroside production in liquid-cultivated compact callus aggregates of *Rhodiola sachalinensis*: manipulation of plant growth regulators and sucrose // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1999. – Vol. 55. – P. 53–58.
23. Zhou X., Wu Y., Wang X., Liu B., Xu H. Salidroside production by hairy roots of *Rhodiola sachalinensis* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* // Biol. Pharm. Bull. – 2007. – Vol. 30(3). – P. 439–442.

THE USE AND BIOTECHNOLOGICAL METHOD OF OBTAINING RAW MATERIALS OF MEDICINAL PLANTS – *RHODIOLA QUADRIFIDA*

A.Yu. STEPANOVA, E.A. GLADKOV, A.I. SOLOVYEVA

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, RAS, Moscow

The article discusses the use of *Rhodiola quadrifida* (rhodiola cold, red brush) as a medicinal plant and a biotechnological method of obtaining its root culture. Two main schemes of agrobacterial transformation were used in the work. The most successful was the technology in which only incubation of plant material in a suspension of agrobacteria was carried out for 12 hours without further cultivation on the medium with agrobacteria. As a result, explants with a root culture (hairy roots) were obtained. Thus, the technology of obtaining the root culture of *Rhodiola quadrifida* has been developed and the conditions for its cultivation have been selected.

Keywords: *Rhodiola quadrifida*, medicinal plant, hairy roots, biotechnological method for obtaining root culture.

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И НУКЛЕАЗ В БИОМЕДИЦИНЕ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Е.Р. ЗАБОЛОЦКАЯ^{1,2*}, Д.О. ВИНОХODOV¹

¹ Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет),
Санкт-Петербург;

² ООО «Завод имени академика В.П. Филатова», Ленинградская область

Обзор посвящен поиску возможного использования протеолитических ферментов и нуклеаз в биомедицине и биотехнологии. В ходе последних десятилетий благодаря новым данным в области биохимии, физиологии, иммунологии и практической медицины ферментные препараты нашли широкое применение при лечении ряда заболеваний. Эти препараты обладают противовоспалительным, противоотечным, фибринолитическим, иммуномодулирующим и вторично анальгезирующим действием благодаря влиянию на ключевые патофизиологические процессы в организме. В обзоре представлены результаты применения ферментных препаратов в различных отраслях медицины и для лечения различных заболеваний.

Ключевые слова: медицина, ферментные препараты, ДНКаза, РНКаза, трипсин, химотрипсин.

Из всех многочисленных процессов, протекающих в живой клетке, едва ли имеется хотя бы один, который не был бы связан с ферментативным катализом. Вследствие этого ферменты имеют очень большое значение в медицине. В последние годы изучается возможность применения ферментных препаратов в комплексной терапии многих заболеваний в различных отраслях медицины.

Протеолитические ферменты (трипсин, химотрипсин, ДНКаза, РНКаза) относятся к препаратам, разрывающим полимеры секрета, обладают прямым действием в ряде мукоактивных препаратов [12].

Применение ДНКазы. Еще в исследованиях 1950–1960-х гг. было выявлено большое содержание ДНК в инфицированном легочном экссудате больных кистозным фиброзом (муковисцидозом) и было показано, что применение бычьей панкреатической ДНКазы приводило к снижению вязкости секрета легких. Были проведены клинические исследования, в которых было выявлено, что применение ДНКазы в виде аэрозоля у пациентов с пневмонией и муковисцидозом эффективно. Хотя в ряде случаев это и вызывает побочные аллергические реакции, которых можно избежать применением рекомбинантной ДНКазы [17]. Вообще все протеоли-

тические ферменты (РНКаза, трипсин, химотрипсин) уменьшают как вязкость, так и эластичность мокроты, обладают противоотечным и противовоспалительным действием. Но применяются они в пульмонологии редко в связи с возможным повреждением легочного матрикса и риском развития тяжелых побочных эффектов. Исключение составляет ДНКаза, которую назначают больным с муковисцидозом [1]. Был продемонстрирован положительный эффект от применения рекомбинантной ДНКазы в виде улучшения легочной функции у больных муковисцидозом в фазе обострения респираторных симптомов. Применение данного препарата хорошо переносится пациентами, не приводит к анафилактическому шоку и аллергическим реакциям [18].

Также было установлено, что рекомбинантная ДНКаза эффективна, безопасна и экономически выгодна при использовании у детей, находящихся на механической вентиляции легких после кардиохирургического вмешательства. Согласно полученным данным, дорназа альфа способствует сокращению времени вентиляции, уменьшению риска образования ателектазов и времени нахождения в отделении детской интенсивной терапии [23]. В ряде работ показана эффективность применения рекомбинантной ДНКазы в комплексной терапии больных муковисцидозом. Препарат увеличивает активность эластазы лейкоцитов человека и лейкоцитарный катепсин человека в бронхиальном секрете пациентов с муковисцидозом [22]. И поскольку применение рекомбинантной ДНКазы является безопасным, хорошо переносится, то оно должно быть включено в стандартную схему лечения

© 2018 г. Заболоцкая Е.Р., Виноходов Д.О.

* **Автор для переписки:**

Заболоцкая Елена Романовна

аспирант кафедры молекулярной биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Завод имени академика В.П. Филатова
E-mail: gelios86@mail.ru

больных муковисцидозом [19]. Необходимо отметить и другие свойства этого уникального фермента, в частности, ДНКазы обеспечивает уменьшение вязкости крови, восстановление реологических свойств, нормализацию клеточного состава, тем самым стимулируя регенеративные процессы в области ишемического некроза тканей [9]. Также было констатировано, что использование ДНКазы с различными антибиотиками повышает результативность антибактериальной терапии. Использование данного фермента можно считать целесообразным для эффективного лечения одонтогенных воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области [13].

Возможно применение данного фермента в других биологических биомедицинских исследованиях. Так, например, описано использование протеолитических ферментов в исследовании морфологии вируса герпеса. При этом применение 0,1% трипсина, химотрипсина и пепсина не вызывало деградации белков вирусного капсида и скоплений вирусной ДНК, тогда как применение ДНКазы в концентрации 0,005% полностью разрушало связующие нити между белками капсида и ДНК [20]. Еще было выявлено, что ДНКазы, продуцируемая вирусом Эпштейна — Барра, обладает уникальными биологическими функциями, помимо расщепления ДНК, и может быть использована в качестве маркера указанного вируса [21]. ДНКазы — уникальный фермент, который обладает свойствами белка и собственно ДНК и потенциально лучший биохимический маркер в диагностической практике. По изменению активности ДНКазы возможна ранняя диагностика инфаркта миокарда и ишемических состояний [24]. И конечно, нельзя не отметить противовирусную активность этого фермента: применение ДНКазы в качестве противовирусного препарата показано в комплексной терапии при лечении опоясывающего герпеса [14].

Применение РНКазы. Не менее интересен фермент рибонуклеаза. Установлено, что бактериальная РНКазы снижает гемагглютинирующую и цитопатическую активность реовируса серотипа I в клеточной культуре. Фермент оказывает максимальный эффект на снижение размножения реовируса на ранних стадиях его репродукции [6]. Также в будущем возможно применение препаратов на основе РНКазы в онкологической практике, поскольку уже выявлено токсическое действие бактериальной РНКазы на линии клеток острого лимфобластного лейкоза человека. Она вызывает гибель этих клеток, индуцируя в них апоптоз, но этот эффект не проявляется в лимфоцитах здоровых доноров, что свидетельствует об ее селективности по отношению к

лейкозным клеткам [3]. Комбинация РНКазы и ДНКазы обладает выраженным противовирусным действием, что может быть использовано при лечении различных форм герпеса.

Применение протеолитических ферментов трипсина и химотрипсина. В современной медицине одной из серьезнейших проблем является образование пролежней у тяжелых больных, что в конечном итоге негативно влияет на общее течение болезни и на возможность выздоровления в целом. Поэтому, кроме антибактериальных препаратов, для местного лечения пролежней применяют ферментные препараты (коллагеназа, ДНКазы, трипсин, химотрипсин) [5]. В настоящее время установлено, что процесс репарации раны является ферментативным с необходимым присутствием влажной среды. Поэтому целесообразно использовать при лечении многих кожных заболеваний гидрогелевые покрытия с иммобилизованными протеолитическими ферментами, например, трипсином, которые способны размягчать и лизировать некротические ткани, обладают антимикробной активностью и охлаждающим действием [11]. Также было отмечено, что фермент трипсин обладает средством к денатурированным белкам, образующимся в процессе воспаления, благодаря чему их пептидные связи становятся более доступными для гидролитического расщепления [2]. Эти свойства ферментов обуславливают их применение в пульмонологии и оториноларингологии. Было обнаружено, что эндобронхиальное введение протеолитических ферментов трипсина и химотрипсина способствует быстрому разжижению вязкого гнойного секрета, уменьшению воспалительной инфильтрации, очищению очагов деструкции от некротических масс и казеоза, что способствует повышению эффективности лечения больных неспецифическими заболеваниями легких и туберкулезом легких [16]. Аналогичным образом отмечена эффективность использования химотрипсина в комплексном лечении острого верхнечелюстного синусита и экссудативного среднего отита [4]. В то же время протеолитические ферменты трипсин и химотрипсин получили широкое применение в офтальмологии, поскольку именно в этой области медицины образование спаек и шварт, небольшие кровоизлияния могут приводить к тяжелым последствиям, вплоть до потери зрения. Сегодня применение протеолитических ферментов, наряду с новейшими антибактериальными, гормональными, антиглаукомными и антигистаминными препаратами, способно повысить эффективность лечения многих глазных болезней [7].

Получены результаты, что *in vitro* трипсин увеличивает скорость свертывания крови, фибринолиза, АДФ- и адреналин-инициируемой агрегации тромбоцитов, а также замедляет скорость гемолиза эритроцитов в гемолитической системе в присутствии комплемента (трипсин разрушает белковые факторы системы комплемента на стадии прединкубации). Эти результаты свидетельствуют, что протекающие в организме высокоспецифические протеолитические процессы могут регулироваться протеазами и ингибиторами протеаз [10].

Таким образом, применение системной энзимотерапии (в том числе использование трипсина и химотрипсина) оказывает как патогенетическое воздействие на развитие патологического процесса, так и повышает биодоступность традиционно назначаемых лекарственных препаратов с одновременным улучшением их переносимости, уменьшением дозировки и длительности приема. Применение ферментных препаратов также является абсолютно безопасным, оправданным методом лечения и способствует уменьшению манифестных клинических проявлений и ускорению сроков выздоровления, в том числе в гинекологии [15].

Также необходимо отметить возможность применения протеолитических ферментов в пищевой промышленности, поскольку уже изучено их применение, в том числе трипсина, для гидролиза белков молока с целью получения гипоаллергенных продуктов для детского и специализированного питания, равно как и для получения компонентов питательных сред в микробиологии [8].

Проанализированные сведения говорят о том, что в современной медицине применение ферментных препаратов остается необходимым и актуальным. Следовательно, актуальной остается задача по получению чистых субстанций, по созданию пролонгированных и иммобилизованных ферментных препаратов, а также новых лекарственных форм на основе этих препаратов.

Литература

1. Анаев Э.Х. Муколитическая терапия: рациональный выбор / Эффективная Фармакотерапия, Медфорум. — М., 2010. — С. 25–28.
2. Безгина Ю.А., Волосова Е.В. Создание биоактивных полимерных материалов при включении протеолитических ферментов // Вестник АПК Ставрополя. — 2013. — № 2(10). — С. 198–200.
3. Бурнышева К.М., Петрушанко И.Ю., Спирин П.В., Прасолов В.С., Макаров А.А., Митькевич В.А. Рибонуклеаза биназа вызывает гибель клеток острого Т-лимфобластного лейкоза, индуцируя в них апоптоз // Молекулярная биология. — 2016. — Т. 50. — № 2. — С. 347–352.
4. Глазников Л.А., Пониделко С.Н. Опыт применения химотрипсина в комплексном лечении экссудативного среднего отита и верхнечелюстного синусита // Поликлиника. — 2010. — № 2. — С. 77–78.
5. Дибиров М.Д. Пролезни: профилактика и лечение. // Стационарозамещающие Технологии / Амбулаторная хирургия. — 2016. — № 1–2(61–62). — С. 55–63.
6. Ефимова М.А., Махмуд Р.Ш., Зеленихин П.В., Сабирова М.И., Колпаков А.И., Ильинская О.Н. Экзогенная РНКаза *Vacillus rutilus* (биназа) подавляет репродукцию реовируса серотипа 1 // Молекулярная биология. — 2017. — Т. 51. — № 1. — С. 111–117.
7. Жабоедова Е.Г., Пархоменко О.Г. Применение химотрипсина и трипсина при лечении заболеваний глаз [Электронный ресурс]. URL: <http://health-ua.com/article/18380-primenenie-himotripsina-i-tripsina-pri-lechenii-zabolevanij-glaz>.
8. Курченко В.П., Головач Т.Н. Гидролиз белков молока ферментными препаратами и протеолитическими системами молочнокислых бактерий // Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. — 2012. — Т. 7. — № 1–2. — С. 106–126.
9. Меламед Д.Е. Применение Дезоксирибонуклеазы в качестве средства для снижения вязкости крови, лечения и профилактики заболеваний, связанных с ишемическим некрозом тканей. Патент № Ru 2 357 752 С2 от 27.02.2007, опубликовано: 10.06.2009, Бюл. № 16.
10. Памирский И.Э., Штарберг М.А., Белоглазова И.Г., Бородин Е.А. Влияние трипсина и ингибитора трипсина соевых бобов на свертывание крови, фибринолиз, агрегацию тромбоцитов и гемолитическую активность комплемента *in vitro* // Дальневосточный медицинский журнал. — 2008. — № 1. — С. 98–100.
11. Романовская И.И. Потенциальное раневое покрытие с трипсином, иммобилизованным в модифицированный поли-N-винилпирролидон // Доповіді Національної Академії Наук України. Біохімія. — 2009. — № 9. — С. 182–187.
12. Соловьева Н.А., Кулакова Г.А., Курмаева Е.А. Мукоактивная терапия при лечении острых респираторных инфекций у детей // Практическая медицина. — 2013. — № 6(75). — С. 191–198.
13. Соловьев М.М., Теу В.В., Бобров А.П., Артеменко К.Л., Мошкевич И.Р., Теу Г.В. Применение фермента дезоксирибонуклеазы у больных с абсцессами и флегмонами челюстно-лицевой области // Стоматология. — 2006. — Т. 85. — № 6. — С. 40–45.
14. Таха Т.В. Опоясывающий герпес: клиника, диагностика, принципы терапии. // Острые и неотложные состояния в практике врача. — 2013. — № 2–3. — С. 61–64.

15. Ходжаева Э.С., Сидельникова В.М., Кирющенко П.А., Ходжаева А.С. Применение системной энзимотерапии в акушерстве и гинекологии // Гинекология. — 2003. — Т. 5. — № 6. — С. 2–7.
16. Шпак О.И., Венгерова О.А., Евтушенко О.А., Яцына М.Ф. Применение протеолитических ферментов трипсина и химотрипсина в бронхологической практике // Український пульмонологічний журнал. — 2004. — № 3. — С. 44–45.
17. Aitken M., Burke W., McDonald G., Shak S., Montgomery A., Smith A. Recombinant human DNase inhalation in normal subjects and patients with cystic fibrosis. A phase 1 study // JAMA. — 1992. — Vol. 267(14). — P. 1947–1951.
18. Chalumeau M., Cheron G., Assathiany R. et al. [Mucolytic agents for acute respiratory tract infections in infants: a pharmacoepidemiologic problem?] // Arch. Pediatr. — 2002. — Vol. 9(11). — P. 1128–1136.
19. Fuchs H.J., Borowitz D.S., Christiansen D.H., Morris E.M., Nash M.L., Ramsey B.W., Rosenstein B.J., Smith A.L., Wohl M.E. Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group // N. Engl. J. Med. — 1994. — Vol. 331(10). — P. 637–642.
20. Harms H.K., Matouk E., Tournier C., von der Hardt H. et al. Multicenter, open-label study of recombinant human DNase in cystic fibrosis patients with moderate lung disease. DNase international study group // Pediatr. Pulmonol. — 1998. — Vol. 26(3). — P. 155–161.
21. Kendall S.O. Physical and biological observations on herpesvirus // J. Bacteriol. — 1963. — Vol. 86(5). — P. 999–1009.
22. Liao T.H. Deoxyribonuclease I and its clinical applications // J. Formos Med. Assoc. — 1997. — Vol. 96(7). — P. 481–487.
23. Riethmueller J., Borth-Bruhns Th., Kumpf M., Vonthein R., et al. Recombinant human deoxyribonuclease shortens ventilation time in young, mechanically ventilated children // Pediatric Pulmonology. — 2006. — Vol. 41(1). — P. 61–66.
24. Rochat T., Pastore Fd., Schlegel-Häuter S., Filthuth I., Auckenthaler R., Belli D., Suter S. Aerosolized rhDNase in cystic fibrosis: effect on leucocyte proteases in sputum // Eur. Respir. J. — 1996. — Vol. 9(11). — P. 2200–2206.

THE USE OF PROTEOLYTIC ENZYMES AND NUCLEASES IN BIOMEDICINE AND BIOTECHNOLOGY

E.R. ZABOLOTSKAYA^{1,2}, D.O. VINOHOODOV¹

¹ St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg;

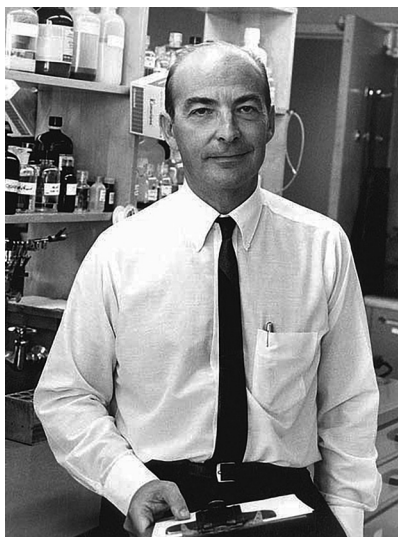
² Factory named after academician V.P. Filatov, Leningrad Region

The review is devoted to the search for the possible use of proteolytic enzymes and nucleases in biomedicine and biotechnology. During the last decades, thanks to new data in the field of biochemistry, physiology, immunology and practical medicine, enzyme preparations have found wide application in the treatment of a number of diseases. These drugs have anti-inflammatory, anti-edematous, fibrinolytic, immunomodulatory and secondary analgesic effects due to the influence on key pathophysiological processes in the body. The review presents the results of the use of enzyme preparations in various branches of medicine and for the treatment of various diseases.

Keywords: medicine, enzyme preparations, DNase, RNase, trypsin, chymotrypsin.

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2018 ГОДА*

ПЕРСОНАЛИИ

К 100-летию со дня рождения Артура Корнберга
(1918–2007)

В 2018 году отмечается значимая памятная дата — 100-летие со дня рождения Артура Корнберга, выдающегося американского биохимика, первым в мире осуществившего матричный синтез ДНК *in vitro*. Это была блестящая победа человеческого разума, которая стала возможной благодаря такой адекватной фигуре, как Корнберг. Он шел к этому более 10 лет, имея достаточную профессиональную подготовку в области работы с ферментами и соответствующих наставников, в числе которых был испанец по происхождению Северо Очоа, совершивший ранее аналогичное открытие для РНК (они, кстати, оба в одном году — 1959 — были удостоены Нобелевской премии).

Журнал уделял достаточное внимание к личности А. Корнберга по случаю его юбилейных дат и в некрологе (например: Воробьев В.С., Воробьева О.В. К 50-летию важной вехи в развитии молекулярной биологии — открытия Артуром Корнбергом ДНК-полимеразы. Журнал биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова, 2006, Т. 2, № 2, С. 63–67). Однако масштаб его вклада в биохимию дает повод для все нового обращения к итогам его деятельности и многогранному таланту, включая своеобразный писательский дар и непревзойденное остроумие.

Не повторяясь в биографических деталях, следует отметить как бы детерминирующее совпадение жизненного пути ученого с такой возвышенной миссией, выпавшей на его долю, как беспрецедентное открытие в сфере материальных основ жизни. Как всегда, решающее значение имеют научное воспитание и интенсивный труд в молодые годы «в нужном месте и в нужное время».

Корни ученого лежат в Австро-Венгерской империи, откуда его родители прибыли с волной первой большой эмиграции в США в конце XIX — начале XX веков. Из этих же мест приехали родственники других выдающихся эмигрантов — химиков (Чаргафф, супруги Кори, Ниренберг и др.). Но многое, конечно, относится и к его собственному неповторимому дарованию, которое сильно выделяло Артура Корнберга из других американских знаменитостей. Взять, к примеру, его редкостные афоризмы или 10 заповедей специалиста по ферментам, среди них один из замечательных: «Не тратьте чистые мысли на неочищенные ферменты». И хотя его авторство приписывается другому, тем не менее с легкой руки Корнберга он вошел в обиход биохимиков. Также ему принадлежит оригинальное высказывание: «Половина того, что мы знаем, неверно; цель науки — определить, какая половина».

Нужно подчеркнуть особо существенное в делах и личности Корнберга, помимо яркого всплеска его таланта, выразившегося в открытии ДНКазы, увенчанном Нобелевской премией. Его высочайший авторитет, приобретенный трудами 1940–1950-х годов, был подкреплён не менее значимым циклом работ 1960–1970-х годов, когда вокруг него в отделе биохимии в Стэнфорде концентрировались специалисты, которым было суждено сделать основополагающие исследования в области молекулярной биологии: обнаружение и применение полимеразы для синтеза длинных цепей ДНК и заполнения пробелов, лигазы для соединения смежных концов цепи, эндонуклеазы III для удаления фосфатных групп на концах цепи, эндонуклеазы фага лямбда для отщепления одного конца цепи ДНК, терминальной трансферазы и т.д. Сам лично А. Корнберг в 1967 г. впервые получил в пробирке биологически активную ДНК (это он осуществил вместе с Гулианом на матрице вируса Синшмейера). В целом исследования А. Корнберга открыли новые направления не только в генетике и биохимии, но и при лечении наследственных заболеваний и рака, Всего у него в библиографии более 300 работ, среди них есть беллетристические произведения.

* Материал подготовлен О.В. Коломбет

Всю свою жизнь он был верен теме ферментов, разрабатывая отдельные аспекты их множественных функций. Есть как нельзя более точная характеристика ферментов, данная Корнбергом: «Это было мое убеждение ... вы должны знать актеров, чтобы понять сюжет. А актеры — ферменты. Они являются мини-химиками, машинами, с помощью которых протекают биологические явления... легендарный ли это вопрос спиртового брожения ... или как светится светлячок...».

Нельзя не упомянуть и обращение А. Корнберга в последние 15 лет жизни к проблеме полифосфатов. Ведь если гений выбирает такую тему, то уж, по крайней мере, историки науки обязаны зафиксировать это на будущее (в нем могут произойти многие пока не предсказанные вещи).

Конечно, не следует забывать в мемориальной заметке и попадание фамилии Корнбергов в список Нобелевских лауреатов, сделавших дубль в двух поколениях (тройной повтор пока практически не достигнут). Дело в том, что и его сын Роджер Корнберг (1947 года рождения) в 2006 году стал лауреатом Нобелевской премии по химии, повторив аналогичный успех отца 1959 года. Причем, история сделала так, что 12-летний мальчик Роджер был на нобелевской церемонии своего родителя в Стокгольме, а соответственно престарелый Артур Корнберг за год до своей смерти присутствовал на таком же мероприятии в 2006 году по случаю награждения его сына. Такие же случаи повторились четыре раза, среди них отец и сын Боры в 1922 и 1975 годах. Не говоря уже о беспрецедентных парах семейства Кюри.

Наверное, излишне говорить о его формальном признании, хотя для истории это важно. Ясно, что, помимо Нобелевской премии, было членство в престижных американских академиях, а самое главное он был избран иностранным членом Лондонского Королевского общества — это одно из высших признаний в научной среде.

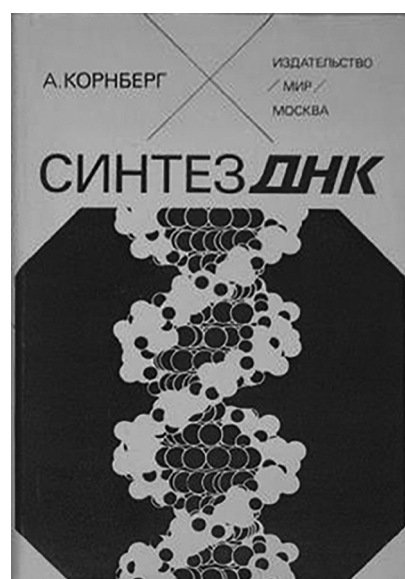
Трудно рассказывать о столь необычной личности, как А. Корнберг, не придавая эмоциональный оттенок излагаемому. А ведь что еще важно для характеристики его активной деятельности — это непрестанное стремление к широкому освещению (вплоть до популяризации) всего того нового, что порождала молекулярная биология 1960—1970-х годов и последующих лет. Вот далеко не полный список таких его трудов (наряду с последовательными журнальными публикациями):

- Enzymatic Synthesis of DNA, 1963.
- Biosynthesis of DNA, 1964.
- DNA Synthesis, 1974.
- DNA Replication, 1980 (2nd edition — 1992).

- For the Love of Enzymes: The Odyssey of a Biochemist, 1989.
- The Golgen Helix: Inside Biotech Ventures, 2002.
- Germ Stories, 2007 (издание для детей).

Что важно: его просветительская миссия достигала и научной среды России, практически одновременно с англоязычными изданиями, поскольку издательства «Мир», «Иностранная литература» и др. регулярно отслеживали все существенное, что появлялось на научном небосклоне, и переводили на русский язык, например:

- Корнберг А. Пути ферментативного синтеза нуклеотидов и полинуклеотидов / В кн.: Химические основы наследственности. Пер. с англ., 1960.
- Корнберг А. Синтез ДНК. Пер. с англ., 1977.



Есть еще одно обстоятельство, которое непременно должно быть упомянуто в мемориальной статье об ученом, — это то, что он был неутомимым поборником примата фундаментальной науки. Особенно важно это в наше утилитарное время, когда производство и бизнес диктуют все и вся, нередко забывая о независимом научном поиске зачастую с непредсказуемым результатом. Вот его замечательные слова, высказанные в письме в журнал «Science» в 1996 году: «Я могу документально подтвердить, что на протяжении всей истории медицины причины всех крупных достижений в диагностике, терапии и предотвращении болезней коренились в любопытстве биологов, химиков и физиков, интересы которых лежали вдалеке от практических приложений базовых исследований к производству лекарств и приборов». Был он и противником преждевременного вкладывая средств в практические проблемы, не решенные или не подготовленные с теоретической точки зрения.

К 80-летию со дня рождения Дейвида Балтимора



Дейвид Балтимор относится к числу ныне живущих классиков молекулярной биологии. Он является соавтором открытия обратной транскриптазы — революционного события в этой научной области, открывшего путь к геной инженерии и другим фундаментальным направлениям в теории и практике. Вместе в Теминым он разделяет эту славу и всемирное признание, отмеченное Нобелевской премией по физиологии и медицине 1975 года (третьим награжденным в том году был Дульбекко).

Биографические факты ученого хорошо известны и были отражены в журнале в 2008 году в связи с его 70-летием. Поэтому акцент в настоящем сообщении будет делаться на содержательную сторону его научных исследований.

Балтимор шел к своему беспрецедентному открытию обратной транскрипции через цикл работ 1960-х годов с РНК-содержащими вирусами. Сначала это были РНК-содержащие вирусы полиомиелита, затем объектом изучения стали опухолеродные вирусы, большая часть которых также содержала только РНК. В результате целенаправленной работы им было установлено, что способность РНК-содержащих вирусов поражать клетки животных обусловлена механизмом обратной транскрипции, то есть возможностью передачи генетической информации не от ДНК к РНК, как было определено центральной догмой молекулярной генетики, а, наоборот, от РНК к ДНК-полимеразе и далее от нее к клетке, которая подвергается опухолевому перерождению.

Надо сказать, что примерно таким же путем шел в своих исследованиях Хоуард Темин и также подтвердил наличие РНК-зависимой ДНК-полимеразы (позже

получившей название обратной транскриптазы или ревертазы). Случилось еще и то, что о своих открытиях они одновременно сообщили в июньском номере журнала «Nature» за 1970 год.

Вирусам, обладающим активностью обратной транскриптазы и существующим как провирусы в ДНК клеток животных, было дано наименование ретровирусов, которые служат причиной, как было показано Балтимором после 1973 года, возникновения ряда заболеваний, в том числе СПИДа, гепатита, некоторых форм рака.

Балтимор пошел дальше в своих исследованиях. Он разработал методы искусственного синтеза генов, определяющих структуру белка в молекулах гемоглобина человека, что фактически закладывало фундамент геной инженерии.

Ученый был творчески и социально активен в 1970-е годы, в том числе был одним из деятельных участников конференции в Асиломаре по поводу этических проблем геной инженерии.

Однако начиная с середины 1980-х годов он был вовлечен в драматическую историю с возможной фальсификацией научных данных в его лаборатории (это — так называемое «дело Иманиши-Кари», или «дело Балтимора»). Она отняла много сил у ученого и отразилась на его творческом потенциале.

Тем не менее его голос всегда присутствует при обсуждении проблем геной инженерии. Так, в 1992 году он подписал «Предупреждение ученых человечеству», в 2016 году — письмо с призывом к Гринпис, ООН и правительствам всего мира о прекращении борьбы с ГМО. Не остался он безучастным к последнему (2018 г.) эксперименту китайского ученого Хе Янкуя с модификацией генома человеческого эмбриона и заявил на публичном обсуждении темы в присутствии автора, что такой подход преждевремен и медицински не обоснован.

Дейвид Балтимор — член Национальной академии наук США (1974) и Национальной медицинской академии США (1988), Американского философского общества (1997) и Американской академии искусств и наук (1974), Папской академии наук (1978), иностранный член Лондонского Королевского общества (1987), Европейской академии (1999) и Французской академии наук (2000), член ЕМВО (1983) и Американской ассоциации иммунологов (1984), а также Американской ассоциации содействия развитию науки, почетный доктор ряда американских и зарубежных университетов, в частности Рокфеллеровского университета (2004).

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).



Подписано к печати 28.12.18
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 5,0. Тираж 1000 экз.

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

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; www.biorosinfo.ru