

2024, Т. 20, № 1

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

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

Редакционный совет

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

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

Зав. редакцией О.В. Коломбет

Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр

медико-социальных проблем»

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

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

ISSN 1996-4741

© Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем, 2024

2024, Vol. 20, No 1

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

Scientific and practical journal

Founded in 2005

Chief editor

R.G. Vasilov

Editorial board

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

Editorial council

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

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

Head edited by O.V. Colombet

Address: 123060, Moscow, PO Box 3

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

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

Founder and Publisher:

ANO «Information and Analytical Center
medical and social problems»

Address: 127581 Moscow, Keramicheskyy proezd, 53, box. one

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

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Published with the support of the
Russian Biotechnology Society named after Yu.A. Ovchinnikov

ISSN 1996-4741

© Information and Analytical Center
for Medical and Social Problems, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. Р.Г. Васильев 5

Оригинальные статьи

- Антибактериальные свойства наночастиц серебра, полученных с использованием экстрактов сибирских растений.
Т.В. Рукосуева, И.Т. Решетнева, Сайед Бейкер, В.А. Сукманов 6
- Влияние различных штаммов лактобактерий на кислородный взрыв нейтрофилов человека.
А.А. Войтенко, Н.Ю. Лотош, Е.А. Куликов, А.Г. Рогов, Р.Г. Васильев, А.А. Селищева 14
- Влияние условий выращивания растений доноров на андрогенетические ответы *in vitro* *Oryza sativa* L.
М.В. Илюшко 22
- Изучение свойств геля на основе альгината натрия с введением в состав сока *Aloe arborescens* для применения его в качестве перспективной биологически активной мягкой лекарственной формы.
М.С. Жигачева 28
- Разработка и сравнительная характеристика кремнезёмных магноиммуносорбентов туляремиальных для иммуноферментного анализа.
А.С. Геогджаян, И.В. Жарникова, А.А. Семирчева, Д.В. Русанова, В.М. Дубянский 35
- Ассоциация генов *LEP* и *TG5* с молочной продуктивностью коров первотелок голштинской породы.
К.Ю. Николаева, Ф.Ф. Зиннатов, Т.М. Ахметов, Ф.Ф. Зиннатов, Р.Р. Хисамов 41
- Характеристика и ростостимулирующие свойства нового штамма бактерий рода *Stenotrophomonas*.
Л.Р. Хакимова, О.В. Чубукова, Е.С. Акимова, Э.Р. Вершинина 48
- Разработка информационной системы для анализа и протоколирования процесса глубинного культивирования бактерий.
Р.Р. Салихов, О.А. Волох, С.В. Борисова, В.Р. Вольников, Е.М. Кузнецова, А.К. Никифоров 55
- Оценка влияния компонентного состава криопротекторов на стабильность аналитических показателей при лиофилизации медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Сыворотка диагностическая холерная не O1 группы O139 адсорбированная кроличья для реакции агглютинации на стекле».
М.В. Овчинникова, А.С. Феськова, И.В. Шульгина, О.А. Лобовикова, Л.В. Зайцева, Т.Ю. Кириллова, А.В. Комиссаров, А.К. Никифоров 61
- Комплексная оценка биокоррозионной активности почвогрунта на трассах нефтепровода с учётом анализа биоплёнки микобиоты.
М.Г. Чеснокова, В.В. Шалай, А.Ю. Миронов 68

Обзоры

- Методы контроля пирогенности для оценки качества лекарственных средств.
М.В. Булатова, А.Б. Рыжиков, С.В. Усова, М.П. Богрянцева 73
- Особенности почвенной фазы существования *Bacillus anthracis*.
А.В. Калинин, Е.А. Котенева, О.И. Цыганкова, А.В. Абрамович 82

Хроника

Юбилейные и знаменательные даты 2024 года 90

Правила для авторов 95

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. R.G. Vasilov 5

Original articles

Antibacterial properties of silver nanoparticles produced using Siberian plant extracts.
T.V. Rukosueva, I.T. Reshetneva, Syed Baker, V.A. Sukmanov 6

The influence of different strains of lactobacilli on the oxygen burst of human neutrophils.
A.A. Voitenok, N.Y. Lotosh, E.A. Kulikov, A.G. Rogov, R.G. Vasilov, A.A. Selishcheva 14

The influence of donor plants growing conditions on androgenetic responses *in vitro* of *Oryza sativa* L.
M.V. Ilyushko 22

Studying the properties of a gel based on sodium alginate with the introduction of *Aloe arborescens* juice to the composition for its application as a promising biologically active soft dosage form.
M.S. Zhigacheva 28

Development and comparative characterization of tularemia silica magnoimmunosorbents for immunoenzyme analysis.
A.S. Geogdžayan, I.V. Zharnikova, A.A. Semircheva, D.V. Rusanova 35

Association of *LEP* and *TC5* genes with milk productivity of Holstein first-calf cows.
K.Yu. Nikolaeva, F.F. Zinnatov, T.M. Akhmetov, F.F. Zinnatova, R.R. Khisamov 41

Characteristics and growth promotional properties of a new strain of bacteria of the genus *Stenotrophomonas* sp.
L.R. Khakimova, O.V. Chubukova, E.S. Akimova, Z.R. Vershinina 48

Development of an information system for analyzing and logging the process of submerged cultivation of bacteria.
R.R. Salikhov, O.A. Volokh, S.V. Borisova, V.R. Vol'nikov, E.M. Kuznetsova, A.K. Nikiforov 55

Assessment of the influence of the component composition of cryoprotectors on the stability of analytical indicators with lyophilization of a medical device for diagnostics *in vitro* «Diagnostic *Cholera* serum of non-O1 group O139 adsorbed in rabbit for reaction agglutination on glass».
M.V. Ovchinnikova, A.S. Feskova, I.V. Shulgina, O.A. Lobovikova,

L.V. Zaitseva, T.Yu. Kirillova, A.V. Comissarov, A.K. Nikiforov 61

Comprehensive assessment of biocorrosive activity of soil on oil pipeline routes taken into account of analysis of mycobiota biofilm.
M.G. Chesnokova, V.V. Shalay, A.Yu. Mironov 68

Reviews

Pyrogenicity control methods for assessing the quality of medicines.
M.V. Bulatova, A.B. Ryzhikov, S.V. Usova, M.P. Bogryantseva 73

Features of the soil phase of the existence of *Bacillus anthracis*.
A.V. Kalinin, E.A. Koteneva, O.I. Tsygankova, A.V. Abramovich 82

Chronicle

Anniversary and significant dates 2024..... 90

Rules for authors 95

К читателям

В первом номере 2024 года публикуется очередная подборка статей.

В первой работе Рукосуевой Т.В. с коллегами предметом изучения было антибактериальное действие наночастиц серебра, полученных с помощью водных экстрактов растений, на штаммы микроорганизмов с различной антибиотикорезистентностью.

Группа авторов из НИЦ «Курчатовский Институт» и биофака МГУ (Войтенок В.В. и др.) исследовала влияние различных штаммов лактобактерий на кислородный взрыв нейтрофилов человека.

Темой статьи Илюшко М.В. (Уссурийск) стало определение условий выращивания растений доноров на андрогенетические ответы *Oryza sativa* L. в культуре пыльников *in vitro* для совершенствования селекционного процесса риса на Дальнем Востоке РФ.

Саратовская аспирантка Жигачева М.С. изучала ранозаживляющие свойства полученного геля и степень высвобождения метилурацила из гелевой матрицы из натуральных природных компонентов.

Коллектив авторов из Ставропольского противочумного института (Геогджаян А.С. и др.) установил сравнительную характеристику кремнезёмных магноиммосорбентов туляремиальных при осуществлении иммуноферментного анализа.

Исследователи из Казани (Николаева К.Ю. и др.) определяли связь молочной продуктивности коров с полиморфизмом генов *LEP* и *TG5*. Наилучшие показатели выявлены у животных с комплексным генотипом *LEP^{TTT}TG5^{TT}*.

Научные сотрудники из Башкирии (Уфа) описали ростостимулирующие свойства ризосферного штамма *Stenotrophomonas* sp. ОВА 2.13 (Хакимова Л.Р. и др.).

Салиховым Р.Р. с коллегами из Саратова разработана база данных для протоколирования аппаратного глубокого культивирования производственных и вакцинных штаммов микроорганизмов в экспериментальной работе и практике получения иммунобиологических препаратов.

Другие саратовские авторы (Овчинникова М.В. и др.) рассматривают возможность применения различных вариантов криопротекторов при производстве медицинского изделия для *in vitro* диагностики «Сыворотка диагностическая холерная не O1 группы O139 адсорбированная кроличья для реакции агглютинации на стекле».

Исследователи из Омска и Москвы (Чеснокова М.Г., Шалай В.В., Миронов А.Ю.) провели комплексную оценку биокоррозионной активности микробиоты почвогрунта на трассах нефтепровода с учётом анализа биоплёнки.

В заключение номера публикуются два обзора. Один посвящён проблеме пирогенности для оценки качества лекарственных средств (Булатова М.В. и др. из центра «Вектор», Новосибирск), другой — рассмотрению особенностей почвенной фазы существования *Bacillus anthracis* (Калинин А.В. и др. из Ставропольского противочумного института).

Традиционно первый номер содержит информацию о знаменательных датах 2024 года.

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

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСТРАКТОВ СИБИРСКИХ РАСТЕНИЙ

Т.В. РУКОСУЕВА^{1*}, И.Т. РЕШЕТНЕВА¹, САЙЕД БЕЙКЕР^{1,2}, В.А. СУКМАНОВ¹

¹ Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия;

² Государственный открытый университет штата Карнатака, Муктаганотри, Майсур, Карнатака, Индия

Глобальной проблемой медицины сегодня является стремительное формирование резистентности к антибиотикам многими микроорганизмами. Цель исследования заключалась в изучении антибактериального действия наночастиц серебра, полученных с помощью водных экстрактов растений, на штаммы микроорганизмов с различной антибиотикорезистентностью. Сибирские растения: лопух большой (*Arctium lappa*), ромашка аптечная (*Matricaria chamomilla*), одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale*) могут служить сырьем для получения наночастиц серебра, обладающих выраженной антибактериальной активностью, в том числе, в отношении полирезистентных штаммов. Штаммы бактерий, выделенные от пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями отделения реанимации и интенсивной терапии, характеризуются приобретенной полирезистентностью. Из всех используемых тест-культур только *Escherichia coli* (ATCC 25922) является штаммом с сохраненной чувствительностью к антибактериальным препаратам. В настоящем исследовании самые значительные размеры зон задержки роста (27–28 мм) были получены в отношении *S. aureus* (MRSA), $p < 0,05$. Добытые результаты дают возможность рассматривать наночастицы серебра как один из альтернативных ресурсов для разработки антимикробных соединений.

Ключевые слова: наночастицы, наночастицы серебра, антибиотикорезистентность, лекарственная устойчивость, синтез наночастиц.

Введение

Антибиотикорезистентность микроорганизмов — одна из глобальных медицинских проблем современности. Эта проблема возникла сразу, как только началось использование первых антибактериальных препаратов. На сегодняшний день в связи с широкомасштабным внедрением антибиотиков выявляется все больше штаммов с множественной лекарственной устойчивостью, что представляет собой серьезное препятствие на пути лечения многих инфекционных заболеваний людей и животных [9]. Быстрое формирование невосприимчивости микроорганизмов к современным препаратам требует поиска альтернативных методов терапии. Отставание в разработке эффективных антибиотиков усугубляет про-

блему устойчивости к противомикробным препаратам. Актуальными в этой связи являются новые подходы к использованию лекарственных растений на основе нанотехнологий, в частности, биосинтез наночастиц металлов, обладающих антибактериальным эффектом [1].

Предложены методы формирования наночастиц различных металлов: серебра, меди, золота, цинка и других. Наночастицы серебра являются более предпочтительными для использования в живых организмах, так как при различных путях поступления не проявляют выраженной токсичности, не обладают мутагенным, канцерогенным, нейротоксическим и эмбриотоксическим действием [11]. Для получения металлических наночастиц предложены физические и химические методы [3, 14]. Однако зачастую — это трудоемкие, дорогостоящие процессы, представляющие потенциальную опасность для окружающей среды и живых организмов. Альтернативным является биологический синтез наночастиц, который имеет ряд преимуществ; частицы, полученные таким способом, являются более стабильными, можно прогнозировать их размер и форму. Кроме того, они имеют низкую себестоимость, экологически безопасны, поскольку при их

© 2024 г. Рукоосуева Т.В., Решетнева И.Т., Бейкер Сайед, Сукманов В.А.

* Автор для переписки:

Рукоосуева Татьяна Владимировна
кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии
КрасГМУ имени проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого,
E-mail: ru-ta@inbox.ru

производстве не используются токсические вещества. Это определяет проведение таких исследований как крайне востребованных на современном этапе.

Целью настоящего исследования явилось изучение антибактериального действия наночастиц серебра, полученных с помощью водных экстрактов растений, на штаммы микроорганизмов с различной чувствительностью к антимикробным препаратам.

Материалы и методы

Исследовали антибактериальные свойства наночастиц серебра, полученных из сибирских растений. Для синтеза наночастиц использовали нитрат серебра и водные экстракты трех видов лекарственных растений: лопух большой (*Arctium lappa*), ромашка аптечная (*Matricaria chamomilla*), одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale*).

Для получения наночастиц растения тщательно промывали и высушивали, затем в стерильных условиях получали растительные экстракты. Центрифугаты водных экстрактов растений смешивали с нитратом серебра, выдерживали на водяной бане в течение 40 мин и вновь центрифугировали.

Для исследования антибактериальных свойств наночастиц использовали метод колодезной диффузии в твердой питательной среде (well diffusion method). Тест-культуры сеяли на питательный агар Мюллера – Хинтон методом «газона», после чего в агаре стерильным пробойником диаметром 5 мм делали «колодцы», в которые вносили 0,1 мл взвеси исследуемых наночастиц. Чашки Петри помещали на 30 мин. в холодильник (+4 – +5 °С), затем инкубировали в термостате при 35 °С в течение 18–24 часов.

Инокулом тест-культур готовили в стерильном физиологическом растворе в концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл (0,5 McFarland Standard).

Антибактериальную активность исследовали на семи тест-культурах: коллекционных штаммах American Type Culture Collection (ATCC) – *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 38591) и клинических штаммах, характеризующихся лекарственной устойчивостью к антимикробным химиопрепаратам, выделенных от пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями – *Klebsiella pneumoniae*, два штамма *Pseudomonas aeruginosa*, два штамма *Acinetobacter baumannii* (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика чувствительности тест-культур клинических штаммов к антибактериальным препаратам

| Тест-культуры | Антибактериальные препараты | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|-----------------------------|-------------|------------|---------|-----------|---------|----------------|------------|----------|----------------|----------------|---------------|
| | β -лактамы | | | | | | Аминогликозиды | | | Фтор-хинолоны | Ко-тримоксазол | Хлорамфеникол |
| | Тикарцилин/ Клавуланат | Цефеперазон | Цефтазидим | Цефипим | Меропинем | Импинем | Гентамицин | Тобрамицин | Амикацин | Ципрофлоксацин | | |
| <i>K. pneumoniae</i> | - | - | R | R | R | S | R | - | R | S | - | - |
| <i>P. aeruginosa</i> (штамм 1) | R | R | R | R | R | S | R | R | R | R | R | R |
| <i>P. aeruginosa</i> (штамм 2) | R | S | S | S | R | S | S | S | S | R | R | R |
| <i>A. baumannii</i> (штамм 1) | R | R | R | R | R | R | R | S | R | R | R | R |
| <i>A. baumannii</i> (штамм 2) | R | R | R | R | R | S | R | R | S | R | R | R |

Примечание: «R» – устойчивые культуры; «S» – чувствительные культуры; «-» – не определяли.

Для оценки антибактериальной активности исследуемых объектов проводили измерения видимой зоны задержки роста культуры бактерий. Отсутствие зоны задержки роста указывало на то, что культура бактерий не чувствительна к исследуемым наночастицам.

Для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИС) использовали микрометод серийных разведений в жидкой питательной среде.

Для этого в ячейки 96-луночной полистироловой панели вносили по 0,05 мл бульона Мюллера – Хинтон. В 1-ю и 3-ю ячейку добавляли взвесь наночастиц до концентрации 5 мг/мл, смешивали с содержимым ячейки. Содержимое третьей ячейки переносили дальше по ряду, уменьшая концентрацию наночастиц вдвое. Затем в каждую лунку, начиная со второй, добавляли по 0,05 мл микробной взвеси. Первые две ячейки ряда служили контролями: первая – контроль стерильности исследуемого образца наночастиц, вторая – контроль роста культуры. Планшеты инкубировали в термостате при 35 °С в течение 18–24 часов. После инкубации в каждую лунку вносили резазурин как маркер роста микроорганизмов. Свидетельством роста культуры являлось изменение цвета с синего на розовый.

Все исследования с каждым испытуемым образцом проводили в трех повторностях. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета прикладных программ STATISTICA (StatSoft. Inc., v. 12). Данные представлены как среднее (M) ± средняя ошибка средней арифметической (m). Для оценки различий измерений применяли t-критерий Стьюдента. Различия между данными считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что все исследуемые образцы наночастиц серебра, полученные методом «зеленого синтеза» с использованием растительных экстрактов лопуха большого, ромашки аптечной и одуванчика лекарственного, проявили заметную антимикробную активность (рис. 1).

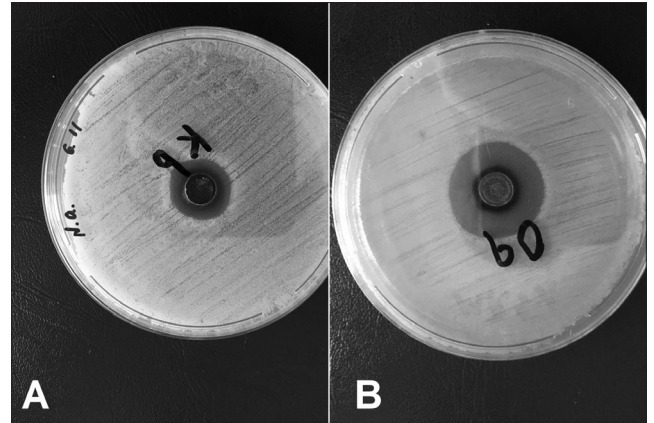


Рис. 1. Метод колодезной диффузии. Зоны задержки роста микроорганизмов суспензией наночастиц серебра, полученных с помощью экстракта одуванчика лекарственного. А: *K. pneumoniae*, В: *P. aeruginosa*

Выявлен ингибирующий эффект в отношении штаммов *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 38591), *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*. В результате применения метода колодезной диффузии полученные диаметры зон задержки роста составили от 14 до 28 мм (табл. 2).

Таблица 2

Антибактериальная активность наночастиц серебра

| Растения – индукторы биосинтеза наночастиц | Диаметры зон задержки роста тест-культур (мм) | | | | | | | M* ± m |
|--|---|---------------------|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------|
| | MRSA | <i>E. coli</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>P. aeruginosa</i> (штамм 1) | <i>P. aeruginosa</i> (штамм 2) | <i>A. baumannii</i> (штамм 1) | <i>A. baumannii</i> (штамм 2) | |
| Лопух большой | 28 | 23 | 15 | 17 | 21 | 18 | 19 | 20,14 ± 1,77 |
| Одуванчик лекарственный | 27 | 23 | 14 | 18 | 21 | 23 | 17 | 20,43 ± 1,79 |
| Ромашка аптечная | 27 | 22 | 17 | 18 | 21 | 18 | 18 | 20,14 ± 1,44 |
| M** ± m | 27,33 ± 0,41 | 22,67 ± 0,41 | 15,33 ± 1,08 | 17,67 ± 0,41 | 21 ± 0,0 | 19,67 ± 2,04 | 18,0 ± 0,71 | |

Примечание: M* – средняя арифметическая диаметров зон задержки роста при воздействии наночастиц, синтезированных с использованием определенного растения; M** – средняя арифметическая диаметров зон задержки роста конкретного штамма микроорганизма; m – средняя ошибка средней арифметической

Максимальные зоны задержки роста — 27–28 мм наблюдались на чашках *S. aureus* (MRSA), что значительно выше зон, полученных на посевах с другими микроорганизмами ($p < 0,05$).

Зоны задержки роста вокруг «колодцев» с наночастицами серебра, синтезированными с помощью экстракта лопуха большого, на различных штаммах тест-культур составили от 15 до 28 мм. Зоны задержки роста при воздействии наночастиц одуванчика лекарственного зафиксированы в интервале от 14 до 27 мм; ромашки аптечной — от 17 до 27 мм. При этом влияние исследуемых наночастиц на микроорганизмы

практически не зависело от вида растения, с помощью которого они были получены. Средние значения диаметров отмечены на уровне около 20 мм (от $20,14 \pm 1,77$ до $20,43 \pm 1,79$).

Минимальные ингибирующие концентрации (МИС) наночастиц серебра, полученных путем биосинтеза с использованием лопуха большого, ромашки аптечной, одуванчика лекарственного для разных видов микроорганизмов, представлены в таблице 3, находились в пределах от 0,16 в отношении *A. baumannii* (штамм 1) до 1,25 мкг/мл в отношении *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* (штамм 2).

Таблица 3

Минимальная ингибирующая концентрация (МИС) наночастиц серебра (мкг/мл)

| Штаммы микроорганизмов | Растения — индукторы биосинтеза наночастиц | | | |
|--------------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | Лопух большой | Ромашка аптечная | Одуванчик лекарственный | $M^* \pm m$ |
| MRSA | 0,62 | 0,62 | 0,31 | $0,52 \pm 0,13$ |
| <i>E. coli</i> | 1,25 | 0,62 | 0,62 | $0,83 \pm 0,26$ |
| <i>K. pneumoniae</i> | 1,25 | 1,25 | 1,25 | $1,25 \pm 0,00$ |
| <i>P. aeruginosa</i> (штамм 1) | 0,62 | 0,31 | 0,31 | $0,41 \pm 0,13$ |
| <i>P. aeruginosa</i> (штамм 2) | 1,25 | 0,31 | 0,62 | $0,73 \pm 0,34$ |
| <i>A. baumannii</i> (штамм 1) | 0,16 | 0,31 | 0,62 | $0,36 \pm 0,17$ |
| <i>A. baumannii</i> (штамм 2) | 0,31 | 0,31 | 0,31 | $0,31 \pm 0,00$ |
| $M^{**} \pm m$ | $0,78 \pm 0,19$ | $0,53 \pm 0,14$ | $0,58 \pm 0,14$ | |

Примечание: M^* — средняя арифметическая МИС для конкретного штамма микроорганизма; M^{**} — средняя арифметическая МИС при воздействии наночастиц, синтезированных с использованием определенного растения; m — средняя ошибка средней арифметической.

При этом самая высокая доза наночастиц (1,25 мкг/мл), зарегистрированная в отношении *K. pneumoniae*, не зависела от вида использованных растений.

Для биосинтеза наночастиц использованы растения, произрастающие в экологически чистых районах Красноярского края: лопух большой, ромашка аптечная, одуванчик лекарственный. Эти растения представляют интерес, так как являются доступным сырьем и известны в фармацевтике своими лечебными свойствами. Данные, указывающие на возможность их применения для «зеленого синтеза» наночастиц, в литературе не найдены.

Полученные нами результаты подавления роста микроорганизмов указывают на имеющуюся биологиче-

скую активность наночастиц, независимо от того, какое именно растение использовалось в качестве индуктора синтеза. Сопоставимые значения зон задержки роста и МИС, зарегистрированные при воздействии наночастиц серебра разного происхождения, косвенно свидетельствуют об отсутствии принципиальных отличий в механизме антибактериального действия полученных соединений.

Антибактериальную активность наночастиц серебра, полученных при помощи растительных экстрактов, изучали на семи штаммах тест-культур, два из которых — эталонные штаммы Американской коллекции типовых культур (АТСС) и пять — клинических штаммов.

Штаммы бактерий, выделенные от пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями отделения реанимации и интенсивной терапии, характеризуются приобретенной полирезистентностью (см. табл. 1). Выбор этих микроорганизмов для исследования обусловлен их эпидемиологической и клинической значимостью, так как именно эти представители на сегодняшний день являются основными возбудителями гнойно-воспалительных заболеваний, в том числе госпитальных инфекций, которые трудно поддаются антибактериальной терапии, нередко проявляют устойчивость к дезинфицирующим средствам, что представляет собой проблему современной медицины. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), эти бактерии являются основными патогенами, приводящими к максимальному числу смертей, связанных с антибиотикорезистентностью [6]. Из всех используемых тест-культур только *Escherichia coli* (ATCC 25922) является штаммом с сохраненной чувствительностью к антибактериальным препаратам.

В целом, не отмечено существенных различий в размерах зон задержки роста и МИС между эталонными штаммами *Escherichia coli* (ATCC 25922) и полирезистентными штаммами других видов бактерий. Это может свидетельствовать о том, что наночастицы серебра имеют большое количество молекулярных мишеней и разнообразие механизмов повреждающего действия в бактериальной клетке [8, 10]. Это обуславливает их эффективность, в том числе в отношении микроорганизмов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью, и затрудняет выработку резистентности к их действию [12, 15].

Обращает на себя внимание то, что во всех исследованиях более высокие минимальные ингибирующие концентрации наночастиц зарегистрированы для *K. pneumoniae* ($1,25 \pm 0,00$ мкг/мл), различия статистически значимы ($p < 0,05$). Это согласуется и с результатами метода колодезной диффузии, *K. pneumoniae* имеет наименьшие диаметры зон задержки роста при воздействии всех вариантов полученных нами наночастиц ($15,33 \pm 1,08$ мм). Возможно, наличие мощной капсулы у клебсиеллы снижает проникающую способность наночастиц в клетку. Аналогичные результаты низкой чувствительности *K. pneumoniae* к водным растворам наночастиц серебра отмечены также в работах других авторов [4].

В доступных источниках литературы нет однозначного мнения о влиянии наночастиц металлов на грамположительные и грамотрицательные бактерии

в связи с различным строением их клеточной стенки. Этот вопрос представляет интерес, так как клеточная стенка является одной из мишеней для действия антибиотиков. Подбор культур для проведения наших исследований включал в себя грамположительные бактерии — *Methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 38591) и грамотрицательные бактерии — *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae*, два штамма *Pseudomonas aeruginosa*, два штамма *Acinetobacter baumannii*.

В настоящем исследовании самые значительные размеры зон задержки роста (27–28 мм) были получены в отношении *S. aureus* (MRSA), $p < 0,05$. Так как *S. aureus* из всех тест-культур, выбранных для исследования, является грамположительным микроорганизмом и, кроме того, полирезистентным штаммом (MRSA), с высокой долей вероятности можно предположить, что полученные нами наночастицы серебра являются более эффективными по отношению к грамположительным бактериям. Подобный феномен отмечен в работах других авторов [4]. С другой стороны, в некоторых исследованиях получен противоположный результат: более эффективными наночастицы серебра оказались в отношении полирезистентных грамотрицательных микроорганизмов, минимальные подавляющие концентрации для грамположительных бактерий оказались выше [2, 5]. Это может быть связано с влиянием различных факторов: способа получения наночастиц, химического состава, формы, размера и других параметров, а также особенностями конкретного штамма микроорганизма [7, 13].

Заключение

Сибирские растения (лопух большой, ромашка аптечная, одуванчик лекарственный) могут служить сырьем для получения биологически активных металлосодержащих наночастиц. Наночастицы серебра, синтезированные с помощью водных растительных экстрактов, обладают антибактериальной активностью, являются эффективными, в том числе, в отношении полиантибиотикорезистентных штаммов бактерий. Минимальные ингибирующие концентрации наночастиц серебра составляют от 0,16 до 1,25 мкг/мл. Полученные в настоящем исследовании результаты позволяют рассматривать наночастицы серебра — продукт «зеленого синтеза» — как один из альтернативных ресурсов для борьбы с устойчивостью к противомикробным препаратам.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование. Исследование проведено без внешнего финансирования.

Литература

1. Горелкин П., Калинина Н., Лав А., Макаров В., Тальянский М., Яминский И. Синтез наночастиц с использованием растений // *Наноиндустрия*. – 2012. – № 7. – С. 16–23.
2. Довнар Р.И., Смотровин С.М., Ануфрик С.С., Соколова Т.Н., Анучин С.Н., Иоскевич Н.Н. Антибактериальные и физико-химические свойства наночастиц серебра и оксида цинка // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. – 2022. – Т. 20. – № 1. – С. 98–107.
3. Макаров В.В., Лав А., Синицына О.В., Макарова С.С., Яминский И.В., Тальянский М.Э., Калинина Н.О. «Зеленые» нанотехнологии: синтез металлических наночастиц с использованием растений // *Acta Naturae*. – 2014. – Т. 6. – № 1. – С. 37–47.
4. Нечаева О.В., Шульгина Т.А., Зубова К.В., Глинская Е.В., Беспалова Н.В., Дарьин Н.И. и соавт. Антибактериальная активность водных дисперсий наночастиц серебра в отношении возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний // *Инфекция и иммунитет*. – 2022. – Т. 12. – № 4. – С. 755–764.
5. Седякина Н.Е., Решетова В.Ю., Кривошепов А.Ф., Буторова И.А., Фельдман Н.Б., Луценко С.В. и соавт. Антибактериальная активность биodeградируемых частиц на основе хитозана, содержащих коллоидное серебро // *Биотехнология*. – 2020. – Т. 36. – № 4. – С. 87–93.
6. Стецюк О.У., Коваленко Т.Н., Андреева И.В., Белькова Ю.А. Неизвестное об известном: комбинации цефалоспоринов III–IV поколения с сульбактамом. КМАХ. – 2023. – Т. 25. – № 1. – С. 41–55.
7. Фастовец И.А., Верховцева Н.В., Пашкевич Е.Б., Нептрисов А.И. Наночастицы серебра: токсическое действие на микроорганизмы и взаимодействие с высшими растениями // *Проблемы агрохимии и экологии*. – 2017. – № 1. – С. 51–62.
8. Хина А.Г., Крутяков Ю.А. Сходство и различия в механизме антибактериального действия ионов и наночастиц серебра // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2021. – Т. 57. – № 6. – С. 536–548.
9. Эверстова А.А., Гаврильев В.С., Бубякина И.И., Климова Т.М. Антибиотикорезистентность внебольничных изолятов *Escherichia coli* в Республике Саха (Якутия) // *Сибирское медицинское обозрение*. – 2018. – № 6. – С. 53–57.
10. Arokiyaraj S., Vincent S., Saravanan M., Lee Y., Oh Y.K., Kim K.H. Green synthesis of silver nanoparticles using *Rheum*

- palmatum* root extract and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* // *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. – 2017. – Vol. 45. – No. 2. – P. 372–379.
11. Lansdown A.B. A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices // *Adv. Pharmacol. Sci.* – 2010. – Vol. 2010. – Art. 910686. doi: 10.1155/2010/910686.
 12. Mijndonckx K., Leys N., Mahillon J., Silver S., Van Houdt R. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance // *Biometals*. – 2013. – Vol. 26. – No. 4. – P. 609–621.
 13. Syed B., Perianova O.V., Prudnikova S.V., Kuzmin A., Potkina N.K., Khohlova O.Y., Lobova T.I. Phyto-genic nanoparticles to combat multi drug resistant pathogens and photocatalytic degradation of dyes // *BioNanoScience*. – 2020. – No. 10. – P. 486–492.
 14. Tsuji M., Hashimoto M., Nishizawa Y., Kubokawa M., Tsuji T. Microwave-assisted synthesis of metallic nanostructures in solution // *Chemistry*. – 2005. – Vol. 11. – No. 2. – P. 440–452.
 15. Yamanaka M., Hara K., Kudo J. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol. 71. – No. 11. – P. 7589–7593.

References

1. Gorelkin P, Kalinina N, Lav A, Makarov V, Tal'yanskiy M, Yaminskiy I. Sintez nanochastits s ispol'zovaniyem rasteniy. *Nanoindustriya* 2012; 7:16–23. (in Russian).
2. Dovnar RI, Smotrin SM, Anufrik SS, Sokolova TN, Anuchin SN, Ioskevich NN. Antibakterial'nyye i fiziko-khimicheskiye svoystva nanochastits serebra i oksida tsinka. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* 2022; 20(1):98–107 (in Russian).
3. Makarov VV, Lav A, Sinitsyna OV, Makarova SS, Yaminskiy IV, Tal'yanskiy ME, Kalinina NO. «Zelenyye» nanotekhnologii: sintez metallicheskih nanochastits s ispol'zovaniyem rasteniy. *Acta Naturae* 2014; 6(1):37–47 (in Russian).
4. Nechayeva OV, Shul'gina TA, Zubova KV, Glinskaya YeV, Bespalova NV, Dar'in NI i soavt. Antimikrobnaya aktivnost' vodnykh dispersiy nanochastits serebra v otnoshenii vzbuditeley gnoyno-vozpалitel'nykh zabolevaniy. *Infektsiya i immunitet* 2022; 12(4):755–764 (in Russian).
5. Sedyakina NYe, Reshetova VYU, Krivoshchepov AF, Butorova IA, Fel'dman NB, Lutsenko SV i soavt. Antibakterial'naya aktivnost' biodegradiruyemykh chastits na osnove khitozana, soderzhashchikh kolloidnoye serebro. *Biotehnologiya* 2020; 36(4):87–93 (in Russian).

6. Stetsyuk OU, Kovalenko TN, Andreyeva IV, Bel'kova YuA. Neizvestnoye ob izvestnom: kombinatsii tsefalosporinov III–IV pokoleniya s sul'baktamom. *КМАХН* 2023; 25(1):41–55 (in Russian).
7. Fastovets IA, Verkhovtseva NV, Pashkevich YeB, Netrusov AI. Nanochastitsy serebra: toksicheskoye deystviye na mikroorganizmy i vzaimodeystviye s vysshimi rasteniyami. *Problemy agrokhimii i ekologii* 2017; 1:51–62 (in Russian).
8. Khina AG, Krutyakov YuA. Skhodstvo i razlichiya v mekhanizme antibakterial'nogo deystviya ionov i nanochastits serebra. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* 2021; 57(6):536–548 (in Russian).
9. Everstova AA, Gavril'yev VS, Bubyakina II, Klimova TM. Antibiotikorezistentnost' vnebol'nichnykh izolyatov *Escherichia coli* v Respublike Sakha (Yakutiya). *Sibirskoye meditsinskoye obozreniye* 2018; 6:53–57 (in Russian).
10. Arokiyaraj S, Vincent S, Saravanan M, Lee Y, Oh YK, Kim KH. Green synthesis of silver nanoparticles using *Rheum palmatum* root extract and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 2017; 45(2):372–379.
11. Lansdown A.B. A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices. *Adv. Pharmacol. Sci* 2010; 2010:910686. doi: 10.1155/2010/910686.
12. Mijndonckx K., Leys N., Mahillon J., Silver S., Van Houdt R. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biometals* 2013; 26(4):609–621.
13. Syed B., Perianova O.V., Prudnikova S.V., Kuzmin A., Potkina N.K., Khohlova O.Y., Lobova T.I. Phytogenic nanoparticles to combat multi drug resistant pathogens and photocatalytic degradation of dyes. *BioNanoScience* 2020(10):486–492.
14. Tsuji M., Hashimoto M., Nishizawa Y., Kubokawa M., Tsuji T. Microwave-assisted synthesis of metallic nanostructures in solution. *Chemistry* 2005; 11(2):440–452.
15. Yamanaka M., Hara K., Kudo J. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Appl. Environ. Microbiol* 2005; 71(11):7589–7593.

ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF SILVER NANOPARTICLES PRODUCED USING SIBERIAN PLANT EXTRACTS

T.V. RUKOSUEVA¹, I.T. RESHETNEVA¹, SYED BAKER^{1,2}, V.A. SUKMANOV¹

¹*Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;*

²*Karnataka State open university, Mysuru, Karnataka, India*

A global medical problem today is the rapid development of antibiotic resistance by many microorganisms. The purpose of the study was to study the antibacterial effect of silver nanoparticles obtained using aqueous plant extracts, on strains of microorganisms with different antibiotic resistance. Siberian plants: burdock (*Arctium lappa*), chamomile (*Matricaria chamomilla*), dandelion (*Taraxacum officinale*) can serve as raw materials for the production of silver nanoparticles, which has pronounced antibacterial activity, including against multidrug-resistant strains. Bacterial strains isolated from patients with purulent-inflammatory diseases of the intensive care unit and intensive care, are characterized by acquired multiresistance. Of all the test cultures used, only *Escherichia coli* (ATCC 25922) is a strain with preserved sensitivity to antibacterial drugs. In the present study, the largest sizes of growth retardation zones (27–28 mm) were obtained against *S. aureus* (MRSA), $p < 0.05$. The obtained results make it possible to consider silver nanoparticles as one of the alternative resources for the development of antimicrobial compounds.

Keywords: nanoparticles, silver nanoparticles, antibiotic resistance, drug resistance, nanoparticle synthesis.

Address:

Rukosueva T.V., Ph.D.

Associate professor of the Department of Microbiology of Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voyno-Yasenetsky,
E-mail: ru-ta@inbox.ru

Для цитирования:

Рукоусева Т.В., Решетнева И.Т., Бейкер Сайед, Сукманов В.А. Антибактериальные свойства наночастиц серебра, полученных с использованием экстрактов сибирских растений. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2024; 20(1):6–13.

For citation:

Rukosueva T.V., Reshetneva I.T., Baker Syed, Sukmanov V.A.. Antibacterial properties of silver nanoparticles produced using Siberian plant extracts. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(1):6–13 (in Russian).

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ НА КИСЛОРОДНЫЙ ВЗРЫВ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА

А.А. ВОЙТЕНОК¹, Н.Ю. ЛОТОШ^{1*}, Е.А. КУЛИКОВ¹, А.Г. РОГОВ¹,
Р.Г. ВАСИЛОВ¹, А.А. СЕЛИЩЕВА^{1,2}

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский Институт»,

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва

Методом люминол-зависимой хемилюминесценции изучено влияние различных штаммов лактобактерий на спонтанное образование активных форм кислорода нейтрофилами крови человека в отсутствие активаторов. В качестве контроля для активации кислородного взрыва применяли латекс и форболовый эфир мирилата ацетата. Использовали штаммы лактобактерий, присутствующие в организме человека, и штаммы, не относящиеся к таковым. Нейтрофилы находились либо в виде суспензии, либо были адгезированы на поверхности планшета. Установили, что большинство изученных штаммов лактобактерий снижает спонтанную хемилюминесценцию нейтрофилов в том случае, когда они находятся в виде суспензии. Если клетки были в адгезивном состоянии, то такие штаммы как *L. brevis* В-5563, *L. helveticus* В-7669 и *L. acidophilus* В-9012 вызывали кислородный взрыв, по интенсивности превышающий спонтанную генерацию активных форм кислорода. В обоих случаях инкубацию нейтрофилов с лактобактериями проводили при соотношении между нейтрофилами и лактобактериями 1:1, 1:10 и 1:100.

Ключевые слова: кислородный взрыв, лактобактерии, люминол-зависимая хемилюминесценция, нейтрофилы человека.

Введение

Полиморфноядерные лейкоциты, или нейтрофилы, являются важнейшими компонентами врожденного иммунного ответа и необходимы для защиты хозяина от микробных патогенов, одновременно сводя к минимуму вредные последствия, опосредованные умирающими или поврежденными клетками [6]. Нейтрофилы относятся к фагоцитирующим клеткам, которые циркулируют в кровотоке, а затем перемещаются в ткани, где также участвуют в антимикробных и воспалительных реакциях. В последние годы показано, что значительная часть этих клеток покидает ткани и мигрирует на поверхность слизистых оболочек, где они и погибают [2]. Разрушаясь в результате некробиоза или апоптоза, нейтрофилы выделяют наружу антимикробные продукты своих гранул, которые влияют на микрофлору, заселяющую слизистые оболочки. Нейтрофилы являются первыми клетками, которые появляются в очаге поражения в результате их рекрутирования цитокинами

[10]. Общеизвестно, что нейтрофилы как эффекторные клетки имеют различные механизмы для выполнения вне- и внутриклеточного киллинга [11]. Они способны связывать бактерии на своей поверхности благодаря наличию рецепторов TLR2, TLR4, TLR5, секретировать антимикробные белки, содержащиеся в гранулах (миелопероксидаза, лизоцим, лактоферрин и др.), снижать жизнеспособность бактерий, воздействуя на них активными формами кислорода, которые синтезируются НАДФН-оксидазой, и наконец, захватывать бактерии по механизму фагоцитоза [1]. В связи с этим нейтрофилы играют ключевую роль в неспецифической защите организма от патогенных бактерий.

Наряду с этим в организме присутствует большое число разных видов бактерий: в кишечнике и слизистых — лактобактерии (лактоациллы) (*L. B*), *E. coli*, бифидобактерии и другие виды бактерий, присутствующие в микробиоте человека.

L. B (лат. *Lactobacillus*) — род грамположительных анаэробных молочнокислых бактерий. Многие виды *L. B* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*) являются нормальной микрофлорой желудочно-кишечного тракта, начиная от полости рта и заканчивая толстой кишкой, и микрофлорой влагалища (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. cellobiosum*), где их основная функция — поддержание

© 2024 г. Войтенок А.А., Лотош Н.Ю., Куликов Е.А., Рогов А.Г., Василев Р.Г., Селищева А.А.

* Автор для переписки:

Лотош Наталья Юрьевна

к.х.н., научный сотрудник НИЦ «Курчатовский институт»

E-mail: natalotosh@gmail.com

кислой среды и подавление роста условно-патогенных микроорганизмов [4, 9].

Поверхностный слой клеточной оболочки ЛБ (S-слой) состоит из множества идентичных белковых субъединиц, образующих симметричный пористый решетчатый слой, полностью покрывающий поверхность клетки. У ЛБ белки S-слоя обнаружены у многих, но не у всех видов. Белки S-слоя *Lactobacillus* демонстрируют потенциал для их использования в качестве носителей антигена при разработке живых пероральных вакцин из-за их адгезивных и иммуномодулирующих свойств, а также общей непатогенности этого вида [7].

ЛБ увеличивают скорость регенерации слизистой оболочки, влияют на синтез антител к родственным, но обладающим патогенными свойствами микроорганизмам, активируют фагоцитоз, а также синтез лизоцима, интерферонов и цитокинов. ЛБ продуцируют ряд гидролитических ферментов, в частности, лактазу, расщепляющую лактозу (молочный сахар), что поддерживает кислотность толстой кишки на уровне pH 5,5–5,6.

Задачей настоящего исследования является оценка влияния разных штаммов ЛБ на функциональное состояние клеток врожденного иммунитета — нейтрофилов, а именно: на образование ими активных форм кислорода. Результат взаимодействия ЛБ с нейтрофилами оценивали методом люминол-зависимой хемилюминесценции для нейтрофилов в суспензии (клетки не адгезированы) и в адгезированном состоянии.

Материалы и методы

В работе использовали: форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА) (Sigma—Aldrich, Германия); люминол, латекс (10%-ная суспензия, размер частиц 1,5 мкм) (ДИАЭМ, Россия); FITC (Molecular probes, США); фикола плотностью 1.077 и 1.019, среду Хенкса (Панэко, Россия); трипановый синий (Русхим, Россия)

Венозную кровь получали от здоровых добровольцев, подписавших информированное согласие. Все манипуляции выполняли согласно протоколу Локального этического комитета по вопросам биомедицинских исследований НИЦ «Курчатовский институт» № НГ-1/01.13 от 11.03.2021.

Нейтрофилы выделяли в градиенте плотности фикола с гипотоническим лизисом в среде Хенкса без фенолового красного. Выделенные нейтрофилы ресуспендировали в той же среде. Выделенная фракция содержала 90,8% клеток, из них 90,4% нейтрофилов. Жизнеспособность клеток, которая составила $92 \pm 4\%$, определяли с помощью трипанового синего. Чистоту

выделенной фракции определяли методом проточной цитометрии по распределению событий по прямому/боковому рассеянию с помощью сортера FACSAria Fusion (Becton Dickinson, США).

Определение активных форм кислорода проводили методом люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ).

Кислородный взрыв (КВ) нейтрофилов в суспензии определяли с помощью хемилюминометра Lum-1200 (ДИСофт, Россия) при 37 °С, объем пробы составил 500 мкл. К суспензии нейтрофилов (2×10^5 кл/мл) в среде Хенкса без фенолового красного добавляли люминол (0,01 мМ), активаторы КВ ФМА (40 нМ) или латекс (10 мкл) (положительные контроли), ЛБ — до концентрации 10^7 кл/мл. Активированный и спонтанный КВ регистрировали в течение 90 мин.

КВ нейтрофилов в адгезированном состоянии определяли на планшетном ридере Varioskan LUX (Thermo Scientific, США) при 37 °С, объем пробы 250 мкл. Нейтрофилы (2×10^5 кл/мл) в среде Хенкса распределяли по белому непрозрачному планшету, инкубировали 15 мин при 37 °С для адгезии, затем добавляли люминол (0,01 мМ), активаторы КВ ФМА (40 нМ) или латекс (10 мкл) и ЛБ в концентрации от 10^3 до 10^7 кл/мл. Значения ХЛ измеряли каждые 15 мин в течение 90 мин. Каждый образец исследовали минимум в трех повторностях.

Определяли площадь под кривой ХЛ, время достижения максимума на кривой ХЛ и интенсивность ХЛ в момент максимальных значений. Каждый штамм был протестирован в 2–4 биологических повторностях.

Количество клеток ЛБ в суспензии валидировали методом проточной цитометрии после окрашивания 20 мкМ FITC (Molecular probes, США) в темноте в течение 30 мин, на проточном цитометре FACSAria Fusion (Becton Dickinson, США).

Все эксперименты проводились в трех биологических повторностях. Статистический анализ проводили посредством однофакторного ANOVA-теста с апостериорным тестом Тьюки. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение или среднего \pm стандартная ошибка среднего (SEM).

Результаты

В данном исследовании методом ХЛ изучали способность разных штаммов ЛБ влиять на активность нейтрофилов человека, о чем судили по образованию активных форм кислорода или их отсутствию, что регистрировалось методом ХЛ. Используемые штаммы ЛБ перечислены в таблице 1.

Таблица 1

Используемые штаммы ЛБ

| № | № штамма в ВКПМ (АТСС) | Происхождение |
|---|--|--|
| 1 | <i>L. acidophilus</i> ВКПМ В-9012 (АТСС 4356) | <i>L. acidophilus</i> у человека находится в желудочно-кишечном тракте, полости рта и влагалище |
| 2 | <i>L. brevis</i> ВКПМ В-5563 (АТСС 367) | У человека <i>L. brevis</i> присутствует в нормальной микрофлоре кишечника и влагалища |
| 3 | <i>L. brevis</i> ВКПМ В-10903 (АТСС 14869) | |
| 4 | <i>L. brevis</i> ВКПМ В-10405 (АТСС 8287) | |
| 5 | <i>L. buchneri</i> ВКПМ В-7641 (АТСС 4005) | <i>L. buchneri</i> используется в качестве бактериального посевного материала для улучшения аэробной стабильности силоса |
| 6 | <i>L. buchneri</i> ВКПМ В-7869 | |
| 7 | <i>L. buchneri</i> ВКПМ В-7659 | |
| 8 | <i>L. gallinarum</i> ВКПМ В-10907 (АТСС 33199) | <i>L. gallinarum</i> — вид лактобацилл, первоначально выделенный из кур и являющийся для них пробиотиком |
| 9 | <i>L. helveticus</i> ВКПМ В-7669 (АТСС 15009) | <i>L. helveticus</i> используется при производстве сыров |

Нейтрофилы выделяли из венозной крови добровольцев по стандартной методике. Чистоту выделенной фракции определяли методом проточной цитометрии. Типичный результат представлен на рисунке 1, из которого следует, что в выделенной фракции нейтрофилов присутствуют целые клетки (90,8% от общего количества частиц в суспензии), разрушенные клетки и дебрис (9,2%), небольшая фракция моноцитов (1,4%) и лимфоцитов (1,1%).

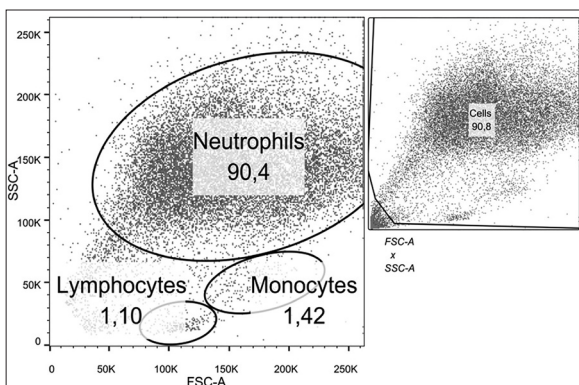


Рис. 1. Распределение популяций клеток в суспензии выделенных нейтрофилов человека, выявленное методом проточной цитометрии

Методом проточной цитометрии показано, что различные штаммы ЛБ по-разному способны поглощать и гидролизовать сложные эфиры. Выявлено, что краситель FITC поглощался клетками ЛБ, но уровень его флуоресценции в штамме *L. buchneri* В-7641 был на несколько порядков выше, чем, например, для *L. helveticus* В-7669 (рис. 2).

Методом ХЛ изучали способность разных штаммов ЛБ активировать нейтрофилы человека либо в суспензии, то есть в нераспластанном, неприкрепленном состоянии, либо адгезированные на поверхности лунки планшета. Принцип метода состоит в том, что активированные нейтрофилы синтезируют активные формы кислорода, которые взаимодействуют с активатором ХЛ люминолом с испусканием кванта света. Результат регистрировали по изменению интенсивности ХЛ люминола. В качестве положительного контроля нейтрофилы активировали либо латексом, либо ФМА. КВ, вызванный ЛБ, сравнивали со спонтанным, то есть ничем не активированным КВ нейтрофилов. Кривую ХЛ записывали в течение 90 мин.

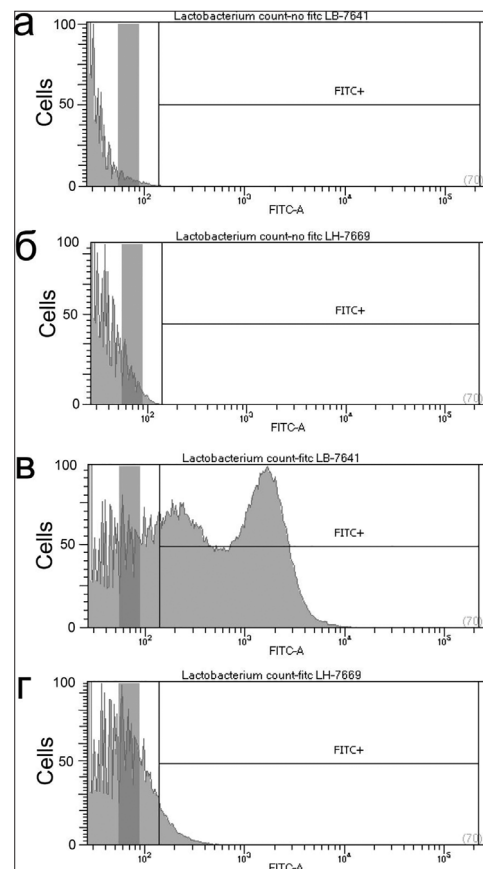


Рис. 2. Распределение лактобактерий *L. buchneri* В-7641 (а, в) и *L. helveticus* В-7669 (б, г) по уровню флуоресценции FITC: а, б — аутофлуоресценция; в, г — после окрашивания FITC

На рисунке 3 приведены характерные кривые ХЛ: спонтанной, активированной латексом и ФМА и при инкубации со следующими штаммами ЛБ: *L. gallinarum* В-10907, *L. brevis* В-10903 и *L. brevis* В-5563. Нейтрофилы инкубировались в суспензии (в кювете люминометра), то есть в свободном состоянии. Видно, что все исследуемые штаммы в количестве клеток от 2×10^5 в мл не оказывали активирующего воздействия на КВ нейтрофилов. В эксперименте количество нейтрофилов равнялось 2×10^5 к/мл, ЛБ — тоже 2×10^5 , то есть соотношение между нейтрофилами и ЛБ составляет 1:1.

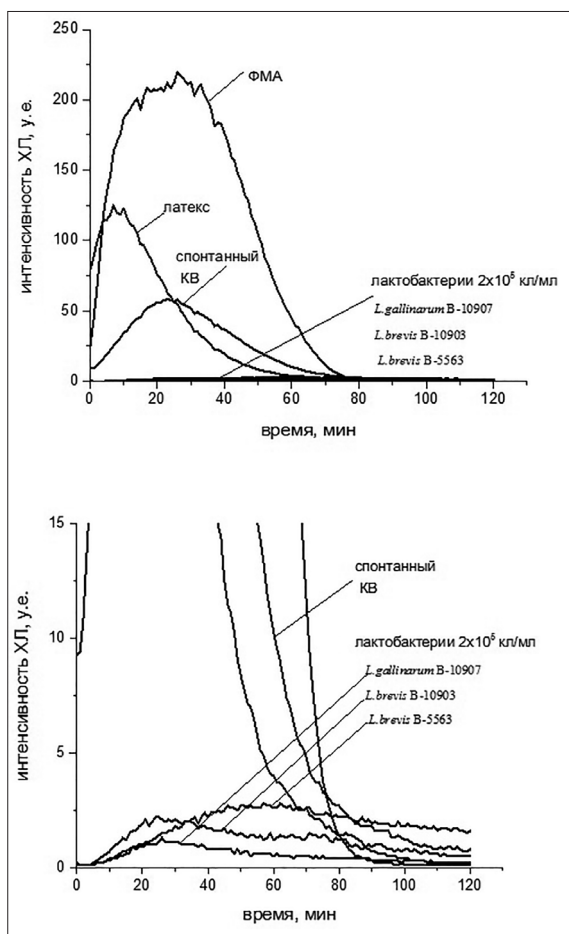


Рис. 3. Кривые люминол-зависимой ХЛ. Влияние *L. gallinarum* В-10907, *L. brevis* В-10903 и *L. brevis* В-5563 на КВ нейтрофилов в неадгезированном состоянии. Нейтрофилы 2×10^5 кл/мл, ЛБ 2×10^5 кл/мл. Измерена спонтанная ХЛ нейтрофилов и активированная латексом или ФМА

Аналогичный результат был получен и для других штаммов ЛБ при соотношении нейтрофилы: ЛБ 1:10 и 1:100 (данные не приводятся).

Рассчитанные площади под кривой ХЛ и интенсивность ХЛ представлены на рисунке 4, из которого

следует, что различные штаммы не только не активируют нейтрофилы, но и подавляют спонтанную ХЛ (то есть кислородный взрыв) в разной степени.

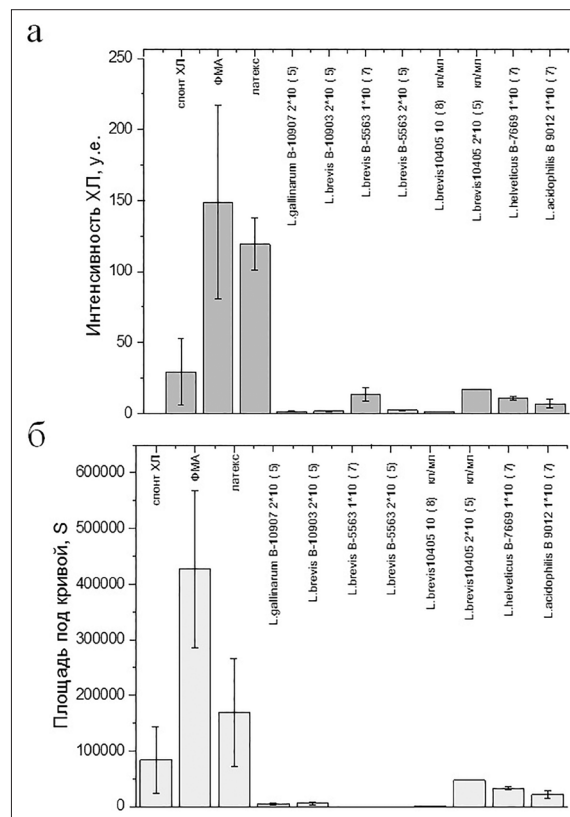


Рис. 4. Максимальная интенсивность кривых ХЛ (а) и площадь под кривой ХЛ (б), рассчитанные по данным люминол-зависимой ХЛ для нейтрофилов в суспензии. Представлены средние значения \pm стандартные отклонения. Данные рассчитаны по нескольким биологическим повторностям для ЛБ в различных концентрациях

В случае нейтрофилов, адгезированных на поверхности дна планшета, была установлена значительная активация для *L. brevis* В-5563, *L. helveticus* В-7669 и *L. acidophilus* В-9012. На рисунке 5 приведены кривые ХЛ для нейтрофилов, активированных ФМА, латексом, а также инкубированных с различным содержанием ЛБ (от 10^5 до 10^7 кл/мл).

Для этих штаммов ЛБ в случае нейтрофилов в суспензии получен результат, аналогичный представленному на рисунке 3, — отсутствие значимой ХЛ. Данные на рисунке 5 свидетельствуют о том, что, как и в случае с суспензией нейтрофилов, адгезированные нейтрофилы развивали быстрый, практически мгновенный, КВ при активации латексом. В отличие от нейтрофилов в суспензии, эти штаммы ЛБ так же вызывали концентрационно-зависимый КВ: эффект был хорошо выражен при содержании клеток 10^6 и 10^7 кл/мл (то есть при со-

отношении нейтрофилов к бактериям 1:10 и 1:100), а при 10^5 кл/мл практически отсутствовал. *L. acidophilus* и *L. helveticus* проявили большую активность, чем *L. brevis*.

Кроме того, для штамма *L. helveticus* была отмечена активация нейтрофилов даже при концентрации 10^5 кл/мл, как следует из рисунка б.

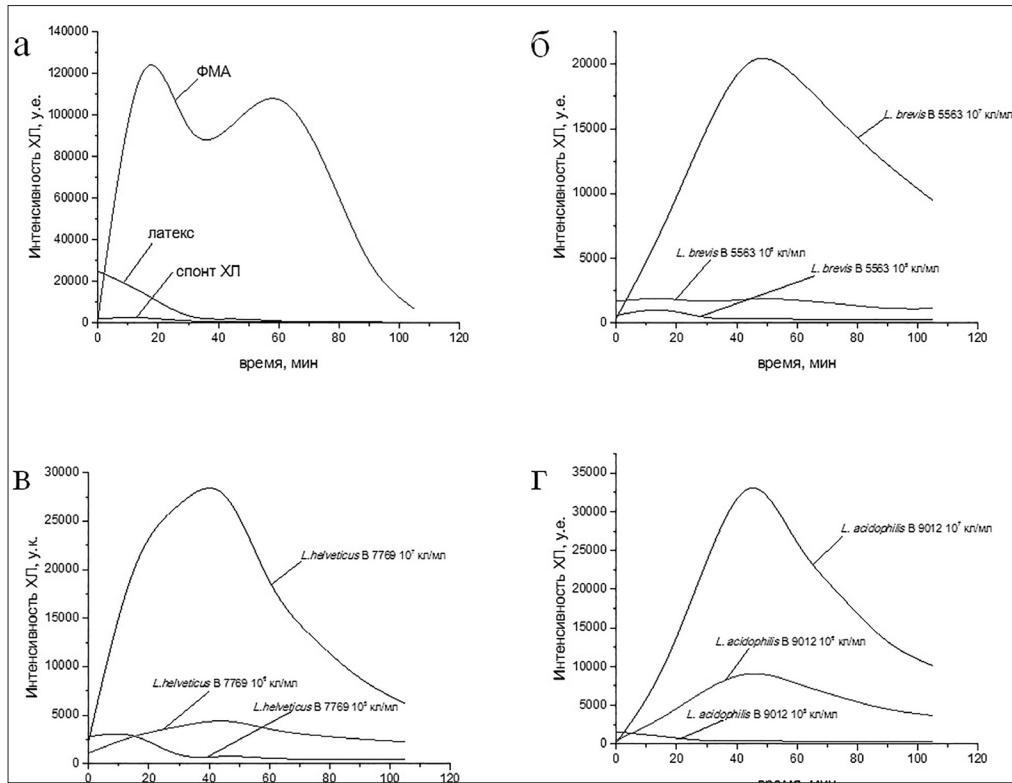


Рис. 5. Кривые ХЛ для нейтрофилов, адгезированных на планшете и активированных ФМА, латексом и для спонтанной ХЛ (а); для нейтрофилов, активированных *L. brevis* В-5563 (б); *L. helveticus* В-7669 (в) и *L. acidophilus* В-9012 (г). Концентрация нейтрофилов 2×10^5 кл/мл, ЛБ – 10^5 , 10^6 и 10^7 кл/мл

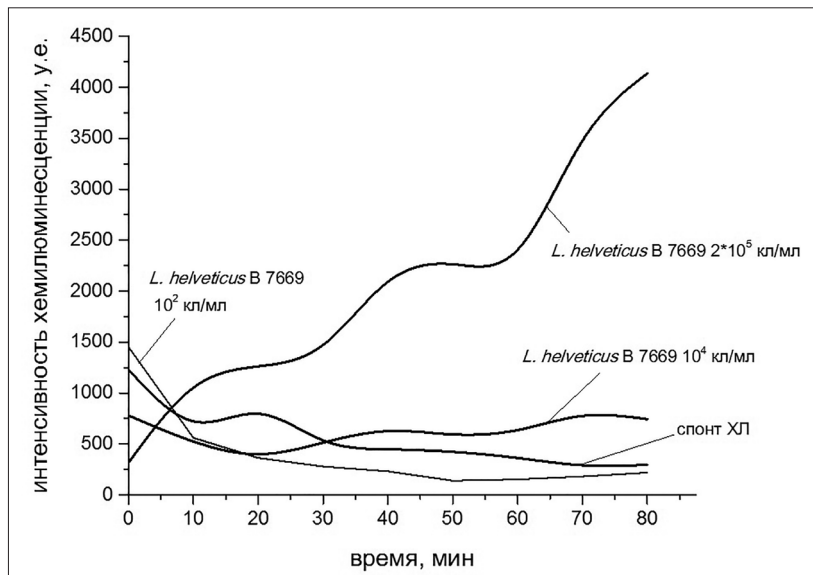


Рис. 6. Кривые ХЛ для *L. helveticus* в концентрации 2×10^5 , 10^4 и 10^2 кл/мл. Нейтрофилы в адгезированном состоянии (2×10^5 кл/мл)

Следует отметить, что в этом случае кривая ХЛ не имеет четко выраженного максимума, а интенсивность ХЛ монотонно увеличивается во времени. Но тем

не менее активация КВ в нейтрофилах под действием таких концентраций *L. helveticus* не вызывает сомнения, так как наблюдается весьма существенное увеличение

интенсивности ХЛ. Необходимо подчеркнуть, что для *L. helveticus* при инкубации с нейтрофилами в составе суспензий такого эффекта не было отмечено. Это свидетельствует о различии в свойствах данного типа клеток в адгезивном и свободном состоянии. Такой вывод подтверждают собственные данные, согласно которым нейтрофилы образуют внеклеточные ловушки в адгезивном состоянии и не образуют их в свободном состоянии [3].

Обсуждение

Для изучения действия ЛБ на функциональную активность нейтрофилов использовали несколько штаммов, которые можно условно разделить на две группы. Первая включает штаммы, которые находятся в организме человека или поступают с пищей, вторая — те, которые не имеют отношения к организму человека.

Фракция нейтрофилов, выделенная из венозной крови человека, имела чистоту 90%, что было показано методом цитометрии. Способность нейтрофилов синтезировать активные формы кислорода анализировали методом люминол-зависимой ХЛ для двух состояний нейтрофилов: в виде суспензии, то есть свободные; прикрепленные к пластиковой поверхности, то есть адсорбированные. При этом регистрировали спонтанный синтез активных форм кислорода, то есть спонтанную ХЛ.

Функциональная активность выделенной фракции НФ была подтверждена появлением кислородного взрыва при инкубации НФ с ФМА или латексом. Показано, что различные штаммы ЛБ способны по-разному поглощать и гидролизовать сложные эфиры. FITC поглощался ЛБ, но уровень его флуоресценции в штамме *L. brevis* В-7641 был на несколько порядков выше, чем для *L. helveticus* В-7669, что можно объяснить различиями в составе и строении клеточной стенки и разной проницаемостью для красителя.

Далее исследовали функциональную активность нейтрофилов при их инкубации с разными штаммами ЛБ. Установили, что практически все исследуемые штаммы ЛБ в концентрации 10^3 – 10^7 кл/мл не вызывают активации нейтрофилов, находящихся в свободном состоянии в виде суспензии. Напротив, инкубация нейтрофилов с ЛБ приводит к существенному уменьшению площади под кривой ХЛ, что свидетельствует о подавлении спонтанной ХЛ. Эти данные согласуются с результатами исследований, в которых было показано, что ЛБ блокировали образование внеклеточных ловушек [13].

В случае адгезированного состояния было зафиксировано образование активных форм кислорода, когда концентрация бактерий составляла 10^6 и 10^7 кл/мл. Только в одном случае — *L. helveticus* — была зарегистрирована активация синтеза активных форм кислорода при концентрации 2×10^5 кл/мл. При сопоставлении действия этого штамма на нейтрофилы в данной концентрации видно, что эффект активации наблюдался только для адгезированных клеток, в то время как в свободном состоянии нейтрофилы не активировались этим штаммом.

Можно сделать предположение, что адгезия нейтрофилов на поверхности уже приводит к некоторой (незначительной) активации клеток, а инкубация с некоторыми штаммами лишь усиливает эту активацию. Иными словами, в присутствии нейтрофилов в ткани процесс взаимодействия ЛБ с нейтрофилами приводит к активации последних, в то время как в свободном состоянии, которое характерно для нейтрофилов в кровотоке, такого взаимодействия не происходит.

Активация нейтрофилов в адгезивном состоянии при инкубации с ЛБ должна приводить к изменению некоторых свойств нейтрофилов, отмеченных в литературе. С одной стороны, ЛБ могут ингибировать образование внеклеточных ловушек нейтрофилов, тем самым снижая провоспалительный эффект их образования [13]. С другой стороны, активация нейтрофилов с помощью *L. rhamnosus*, то есть штамма, характерного для организма человека, усиливала апоптоз [12].

Активация нейтрофилов *L. rhamnosus* зависит от времени инкубации и приводит к последующей активации других типов клеток. Например, совместная инкубация нейтрофилов, дендритных клеток и *L. rhamnosus* приводит к экспрессии на мембране дендритных клеток ряда рецепторов (CD40, CD80, CD86, CD83 и MHC class II) и к продукции цитокинов (IL-10, TNF- α , и IL-12p70) [5].

Особый интерес вызывает изучение функциональной активности и поведения нейтрофилов, которые были рекрутированы эндотелиальными клетками при инфекции. Показано, что трансэндотелиальные нейтрофилы способны поглощать бактерии, но не убивать их. Однако при инкубации эпителиальных клеток в присутствии ИЛ-1 α наблюдали активацию внеклеточной и внутриклеточной бактерицидной активности трансэндотелиальных нейтрофилов [8]. В ходе данного процесса нейтрофилы были адсорбированы на слизистой. Следовательно, для них характерно активированное состояние, изученное в настоящем исследовании.

Заключение

Итак, нейтрофилы играют решающую роль в поддержании гомеостаза разных органов в организме человека, в том числе кишечника. Они имеют различные защитные механизмы для уничтожения микробов, переместившихся через один слой слизистой оболочки эпителиальные клеток, которые образуют критический барьер между просветом кишечника и подлежащими тканями. В выполненном исследовании зафиксирована лишь первая стадия взаимодействия нейтрофилов и непатогенных бактерий, за которыми следуют стадия привлечения других иммунных клеток и высвобождение медиаторов, необходимых для решения воспаления.

Финансирование. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке НИЦ «Курчатовский институт» 5п.5.3: «Разработка универсальных платформ экспресс-диагностики инфекционных заболеваний на основе современных генетических технологий» и договора №07-1-21 МГУ им. М.В. Ломоносова «Физико-химические свойства биомембран в норме, при патологии и воздействии факторов окружающей среды».

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам ресурсного центра молекулярной и клеточной биологии «Молбиотех», в том числе Шапошниковой Д.А., сотрудникам Медицинского научно-клинико-диагностического центра КК НБИКС-ПТ и ведущему научному сотруднику НИЦ «Курчатовский институт» Березиной О.А. за представленные штаммы лактобактерий.

Литература

1. Абатуров А.Е. и др. Развитие иммунного ответа при стафилококковой пневмонии (часть 6) // Здоровье ребенка. — 2017. — Т. 12. — № 7. — С. 848–859.
2. Долгушин И.И. и др. Нейтрофилы и гомеостаз // Екатеринбург: РАН, УрО. — 2001. — 283 с.
3. Лотош Н.Ю. и др. Стеарилламин вызывает образование нейтрофильных внеклеточных ловушек независимо от активных форм кислорода // Цитология. — 2019. — Т. 61. — № 4. — С. 308–318.
4. Новохионов А.А. и др. Физиологические функции и эффективность их применения в составе пробиотиков в педиатрической практике // Эффективная фармакотерапия. — 2013. — № 54. — С. 20–25.

5. Cai S. et al. Lactobacillus rhamnosus GG Activation of dendritic cells and neutrophils depends on the dose and time of exposure // J. Immunol. Res. — 2016. — Vol. 2016. — Art. 7402760. doi: 10.1155/2016/7402760.
6. Fournier B.M. et al. The role of neutrophils during intestinal inflammation // Mucosal Immunol. — 2012. — Vol. 5. — No. 4. — P. 354–366.
7. Hynönen U. et al. Lactobacillus surface layer proteins: Structure, function and applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2013. — Vol. 97. — No. 12. — P. 5225–5243.
8. Liu X. et al. IL-1 α -induced microvascular endothelial cells promote neutrophil killing by increasing MMP-9 concentration and lysozyme activity // Immunol. Res. — 2016. — Vol. 64. — No. 1. — P. 133–142.
9. Peters V.B.M. et al. Mechanisms and immunomodulatory properties of pre- and probiotics // Benef. Microbes. — 2019. — Vol. 10. — No. 3. — P. 225–236.
10. Rigby K.M. et al. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections // Semin. Immunopathol. — 2012. — Vol. 34. — No. 2. — P. 237–259.
11. Spaan A.N. et al. Neutrophils versus *Staphylococcus aureus*: a biological tug of war // Annu. Rev. Microbiol. — 2013. — Vol. 67. — P. 629–650.
12. Sustrova T. et al. Effect of probiotics on the viability of porcine and human neutrophils *in vitro* // Vet. Med. — 2017. — Vol. 62. — No. 12. — P. 637–646.
13. Vong L. et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps // J. Immunol. — 2014. — Vol. 192. — No. 4. — P. 1870–1877.

References

1. Abaturov AYe i dr. Razvitiye immunnogo otveta pri stafilokokkovoy pnevmonii (chast' 6). Zdorov'ye rebenka 2017; 12(7):848–859 (in Russian).
2. Dolgushin II i dr. Neytrofily i gomeostaz. Yekaterinburg: RAN, UrO 2001: 283 (in Russian).
3. Lotosh NYu i dr. Stearilamin vzyvayet obrazovaniye neytrofil'nykh vnekletochnykh lovushek nezavisimo ot aktivnykh form kisloroda. Tsitologiya 2019; 61(4):308–318 (in Russian).
4. Novokshonov AA i dr. Fiziologicheskiye funktsii i effektivnost' ikh primeneniya v sostave probiotikov v pediatricheskoy praktike. Effektivnaya farmakoterapiya 2013; 54:20–25 (in Russian).
5. Cai S et al. Lactobacillus rhamnosus GG Activation of dendritic cells and neutrophils depends on the dose and time of exposure. J Immunol Res 2016; 2016:7402760. doi: 10.1155/2016/7402760.
6. Fournier BM et al. The role of neutrophils during intestinal inflammation. Mucosal Immunol 2012; 5(4):354–366.
7. Hynönen U et al. Lactobacillus surface layer proteins: Structure, function and applications. Appl Microbiol Biotechnol 2013; 97(12):5225–5243.

8. Liu X et al. IL-1 α -induced microvascular endothelial cells promote neutrophil killing by increasing MMP-9 concentration and lysozyme activity. *Immunol Res* 2016; 64(1):133–142.
9. Peters VBM et al. Mechanisms and immunomodulatory properties of pre- and probiotics. *Benef Microbes* 2019; 10(3):225–236.
10. Rigby KM et al. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. *Semin Immunopathol* 2012; 34(2):237–259.
11. Spaan AN et al. Neutrophils versus *Staphylococcus aureus*: a biological tug of war. *Annu Rev Microbiol* 2013; 67:629–650.
12. Sustrova T et al. Effect of probiotics on the viability of porcine and human neutrophils *in vitro*. *Vet Med* 2017; 62(12):637–646.
13. Vong L et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps. *J Immunol* 2014; 192(4):1870–1877.

THE INFLUENCE OF DIFFERENT STRAINS OF LACTOBACILLI ON THE OXYGEN BURST OF HUMAN NEUTROPHILS

A.A. VOITENOK¹, N.Y. LOTOSH¹, E.A. KULIKOV¹, A.G. ROGOV¹,
R.G. VASILOV¹, A.A. SELISHCHEVA^{1,2}

¹ National Research Center «Kurchatov Institute»,

² M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow.

The effect of different strains of the lactobacteria on the spontaneous generation of reactive oxygen species by human blood neutrophils in the absence of activators was studied by the luminol-dependent chemiluminescence technique. Latex and phorbol ester of myristate acetate were used as controls for oxidative burst activation. Lactobacteria found in humans and non-human strains were used. Neutrophils were examined either in suspension or at adherent state in the cell plate. The most of the lactobacillus strains studied were shown to reduce the spontaneous chemiluminescence of neutrophils when they were in suspension form. When cells were in an adherent state, attached to the plate surface, strains such as *L. brevis* B-5563, *L. helveticus* B-7669 and, *L. acidophilus* B-9012 induced an oxidative burst with an intensity exceeding the spontaneous generation of reactive oxygen species. In both cases, incubation of neutrophils with lactobacteria was performed at a ratio between neutrophils and lactobacteria of 1:1, 1:10 and 1:100.

Keywords: oxygen burst, lactobacilli, luminol-dependent chemiluminescence, human neutrophils.

Address:

Lotosh N. Yu., Ph.D. of Chemical Sciences,
Researcher at the National Research Centre «Kurchatov Institute»
E-mail: natalotosh@gmail.com

Для цитирования:

Войтенко А.А., Лотош Н.Ю., Куликов Е.А., Рогов А.Г., Василов Р.Г., Селищева А.А. Влияние различных штаммов лактобактерий на кислородный взрыв нейтрофилов человека. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2024; 20(1):14–21.

For citation:

Voitenok A.A., Lotosh N.Y., Kulikov E.A., Rogov A.G., Vasilov R.G., Selishcheva A.A. The influence of different strains of lactobacilli on the oxygen burst of human neutrophils. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2024; 20(1):14–21 (in Russian).

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ВЫРАЩИВАНИЯ РАСТЕНИЙ ДОНОРОВ НА АНДРОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТВЕТЫ *IN VITRO* *ORYZA SATIVA* L.

М.В. ИЛЮШКО*

ФГБНУ «ФНЦ агробиотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки», Уссурийск

В работе изучено влияние условий выращивания растений доноров на андрогенетические ответы *Oryza sativa* L. в культуре пыльников *in vitro* для совершенствования селекционного процесса риса на Дальнем Востоке РФ. Использовано четыре гибрида F_2 : ([Рассвет × Новатор] × Новатор); (Новатор × [Приозерный 61 × (Дальневосточный × Hayakaze)]); (Хазар × Дарий 23); (Луговой × Вираз). Семена растений доноров высевали 20 мая и выращивали в рассадных ящиках в летний период в трех типах условий: а) в культуральной комнате при температуре 20 °С, фотопериоде 16 ч. и освещенности 4000 лк; б) на вегетационной площадке до середины кушения с последующим переносом в условия культуральной комнаты (комбинированный вариант); в) на вегетационной площадке. Условия выращивания растений доноров оказывали влияние на интенсивность каллусообразования (критерий Крускал – Уоллиса $H=10,36$ при $p=0,006$): на вегетационной площадке – 10,0%, при использовании культуральной комнаты и комбинированного типа выращивания – 5,6 и 6,7%, соответственно. На интенсивность регенерации и тип регенерата условия выращивания не оказали воздействия. В критический период образования микроспор на вегетационной площадке в конце июля произошло среднесуточное снижение температуры воздуха, ночные/дневные колебания температуры оказали позитивное воздействие на культуру пыльников риса. Сделано заключение, что для повышения андрогенетических ответов растений *in vitro* необходимо использовать не просто благоприятные условия или постоянно действующие стрессовые факторы при выращивании растений доноров, а колебания абиотических факторов среды.

Ключевые слова: *Oryza sativa*, андрогенез *in vitro*, растения доноры, условия выращивания, каллусообразование, регенерация.

Введение

Явление гаплоидии широко распространено у покрытосеменных растений и влечет за собой эволюционные последствия [4, 5]. Среди дикорастущих видов известно мало примеров гаплоидных растений из-за их слабой конкурентоспособности в природных условиях [4]. Гаплоидные технологии нашли свое массовое применение в рукотворной микроэволюции — селекции растений [5], и успешно применяются для выведения сортов многих культивируемых видов *Semana*, 2011 [6, 13].

Известны разные способы получения гаплоидов в условиях *in vivo* и *in vitro* [5, 6, 8]. С 1960-х годов массово используется андрогенез *in vitro* (культура пыльников или микроспор) для многих видов растений. Во всех случаях для запуска программы переключения микроспоры с гаме-

тофитного пути на спорофитный применяются стрессовые факторы на разных этапах подготовки и культивирования эксплантов [8, 13]. Первым фактором рассматриваются условия окружающей среды, в которых растут растения доноры, используемые для сбора эксплантов.

Подбором эффективных в андрогенезе *in vitro* условий культивирования растений доноров занимались многие авторы [6, 12]. Однако однозначного представления о лучших условиях для гаплоидии нет. Отсутствует в принципе понимание, совпадают ли лучшие условия выращивания культурного вида (например, для высокой продуктивности или декоративности) с условиями для максимального андрогенетического ответа *in vitro*. По разным факторам получены противоречивые результаты. В одних случаях полевые условия имеют преимущество перед тепличными. На андрогенетические ответы оказывает влияние ряд абиотических факторов: температура, фотопериод, интенсивность освещения, длина светового дня в период роста и бутонизации растений. Это — контролируемые условия, где есть интенсивное каллусообразование как при оптимальных, так и стрессовых режимах. Азотное голодание обеспечивает лучший микроспоровый эмбриогенез, чем подкормки

© 2024 г. Илюшко М.В.

* Автор для переписки:

Илюшко Марина Владиславовна

канд. биол. наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории с.-х. биотехнологии ФГБНУ «ФНЦ агробиотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки»

ilyushkoiris@mail.ru

удобрениями [6, 11, 12]. Остается неясным, нужно ли благоприятствовать росту и развитию растений доноров или все же необходимо найти стрессовое состояние, при котором растение продолжает свое развитие с поиском возможностей аномального оставления потомства.

Культурный вид *Oryza sativa* L. стал одним из первых, где получены андрогенетические ответы в культуре пыльников *in vitro* [1, 9, 11, 12]. Тем не менее исследователи востребованной сельскохозяйственной культуры продолжают поиск возможностей увеличения выхода гаплоидов и удвоенных гаплоидов для использования в генетико-селекционных исследованиях [7, 10, 14]. Цель исследования — изучить влияние условий выращивания растений доноров на андрогенетические ответы *O. sativa* в культуре пыльников *in vitro* для совершенствования селекционного процесса риса на Дальнем Востоке РФ.

Материалы и методы

В работе использованы гибриды F2 *O. sativa*: ((Расвет × Новатор) × Новатор), (Новатор × [Приозерный 61 × (Дальневосточный × Науаказе)]), (Хазар × Дарий 23) и (Луговой × Вираз). Растения доноры высевали 20 мая и выращивали в рассадных ящиках в летний период в трех типах условий: а) в культуральной комнате при температуре 20 °С, фотопериоде 16 ч. и освещенности 4000 лк; б) на вегетационной площадке до середины куцения с последующим переносом в условия культуральной комнаты (комбинированный вариант); в) на вегетационной площадке. Температурные условия роста риса на вегетационной площадке соответствовали биологическим требованиям культуры в дальневосточном регионе с небольшими отклонениями от среднесезонных температур в сторону увеличения до +2,8 °С, за исключением одной декады. Средняя подекадная температура июня 15,9–17,9 °С, июля — 21,1–21,8 °С; в первой декаде августа — 23 °С (период использования растений доноров). В третьей декаде июля отмечено понижение температуры с отклонением от среднесезонных значений до -0,3 °С (табл. 1).

Порядок сбора и предподготовки пыльников проводили согласно работе М.В. Илюшко и соавт. (2023) [2]. Пыльники инокулировали на шесть вариантов питательных сред: N6-1, N6-2, N6-3, MS-и, Mix-1, M8, составы приводились ранее [3]. Для каждого типа условий выращивания растений доноров и варианта среды использовано от трех до семи растений каждого гибрида, 38–116 пыльников. Всего в культуру *in vitro* введено 4432 шт. пыльников риса. Культивировали их в темноте при 25–28 °С.

Таблица 1

Температура воздуха в период роста и развития растений доноров риса *Oryza sativa* L.

| Месяц | Декада | Температура воздуха, °С | | |
|--------|--------|-------------------------|----------------|----------------------------------|
| | | фактическая | среднемесячная | отклонение от средне-многолетней |
| Июнь | I | 15,9 | 14,2 | +1,7 |
| | II | 17,9 | 15,6 | +2,3 |
| | III | 17,8 | 17,2 | +0,6 |
| Июль | I | 21,3 | 18,5 | +2,8 |
| | II | 21,8 | 20,0 | +1,8 |
| | III | 21,1 | 21,4 | -0,3 |
| Август | I | 23,4 | 21,8 | +1,6 |

Каллусы размером 2–5 мм переносили на регенерационную питательную среду N6-рк, укоренение регенератов проводили на среде 1/2MS [2]. Каллусы и растения выращивали в культуральной комнате при 25 °С, 16 ч. фотопериоде и 4000 лк. Укорененные регенераты пересаживали из пробирок в пластиковые стаканы, доращивали в культуральной комнате в тех же условиях и делили на четыре группы: гаплоиды — стерильные растения с очень мелкими цветками; удвоенные гаплоиды — растения с семенами; негаплоидные растения без семян (анеуплоиды) — формировали цветки нормального размера, но не образовывали семян на двух и более метелках; тетраплоиды — растения с очень крупными немногочисленными семенами, выраженным килем и ребристостью на цветочной чешуе. Альбиносы и летальные формы не учитывались.

Для определения различий между типами условий выращивания растений доноров применяли дисперсионный анализ: использовали критерий Фишера (F) и его непараметрический аналог критерий Крускал — Уоллиса (H). Статистический анализ проведен в программе Statistica 10.

Результаты и обсуждение

На интенсивность каллусообразования оказывали влияние два фактора: гибрид (F=6,14 при p=0,009; H=15,99 при p=0,001) и тип условий выращивания растений доноров (табл. 2). На вегетационной площадке интенсивность каллусообразования (10,0%) превышает значения при использовании культуральной комнаты обоих типов выращивания (5,6 и 6,7%). Тем не менее максимальные значения получены именно в регулируемых условиях культуральной комнаты (см. табл. 2). Всего в опыте сформировалось 355 каллусов, из них 22,8%

(81 шт.) образовывали зеленые регенераты. В целом морфогенный потенциал каллусов был выше указанного показателя за счет альбиносов и погибших растений на ранних этапах роста и развития, которые относятся к растениям с сильными полуметаллами в генотипе [1].

Тип условий выращивания не оказывал влияния на регенерацию (табл. 3). Выявлены различия с помо-

щью непараметрического критерия по числу удвоенных гаплоидов ($N=10,94$ при $p=0,05$) и общему числу регенератов на каллусе ($N=13,93$ при $p=0,02$) на различных индукционных питательных средах. Однако нужно отметить, что он не учитывает варианты с нулевым каллусообразованием, а дисперсионный анализ таких различий не показывает.

Таблица 2

Каллусообразование риса *Oryza sativa* L. в андрогенезе *in vitro*

| Статистический показатель | Условия выращивания растений доноров | | |
|---------------------------|--|---|------------------------|
| | культуральная комната | вегетационная площадка → культуральная комната | вегетационная площадка |
| Число пыльников, шт. | 1218 | 1304 | 1910 |
| Среднее значение, % | 6,7 | 5,6 | 10,0 |
| Максимальное значение, % | 52,5 | 25,0 | 33,7 |
| Дисперсионный анализ | $F=1,43$ ($p=0,03$); $N=10,36$ ($p=0,006$) | | |

Таблица 3

Регенерация риса *Oryza sativa* L. в андрогенезе *in vitro*

| Тип регенерата | Условия выращивания растений доноров | | |
|---|--|---|------------------------|
| | культуральная комната | вегетационная площадка → культуральная комната | вегетационная площадка |
| Число каллусов, шт. | 73 | 87 | 195 |
| Гаплоиды ($\bar{\chi}^*/\text{Max}^{**}$) | 0,41/16 | 0,72/12 | 0,49/12 |
| Удвоенные гаплоиды ($\bar{\chi}/\text{Max}$) | 0,23/5 | 0,61/11 | 0,43/15 |
| Тетраплоиды ($\bar{\chi}/\text{Max}$) | 0/0 | 0/0 | 0,02/1 |
| Анеуплоиды ($\bar{\chi}/\text{Max}$) | 0/0 | 0,01/1 | 0,01/1 |
| Общее число регенератов ($\bar{\chi}/\text{Max}$) | 0,64/17 | 1,34/14 | 0,94/16 |
| Дисперсионный анализ | $F=0,85$ ($p=0,56$); $N=0,79-5,75$ ($p=0,06-0,67$) | | |

Примечание: $\bar{\chi}^*$ – среднее число регенератов на каллус, шт.; Max^{**} – максимальное число регенератов на каллус, шт.

В среднем, общее число регенератов и максимальное число регенератов на каллус в эксперименте относительно невысокое. В отдельных случаях на одном каллусе может насчитываться более сотни регенератов, правда внутрикалусная генетическая изменчивость удвоенных гаплоидов очень низкая — один-четыре генотипа на каллус [2]. Для селекционных целей *O. sativa* важнее увеличить не средний регенерационный показатель на каллус, а интенсивность каллусообразования и число каллусов с регенератами. С помощью регулирования условий выращивания растений доноров происходит изменение интенсивности каллусообразования, в данном случае в два раза (см. табл. 2).

Перенос растений доноров с вегетационной площадки в регулируемые условия культуральной комнаты

не принес изменений по сравнению с использованием только культуральной комнаты. Каллусообразование оказалось одинаковым, достоверные различия отсутствуют (см. табл. 2). В регулируемых условиях был установлен температурный режим $20\text{ }^\circ\text{C}$, что является низкой температурой для фазы трубкования и выхода флагового листа риса, когда срезаются стебли с метелками во влагалище листа для введения пыльников в культуру *in vitro*. Можно было ожидать, что погранично низкая для риса температура станет индуктором каллусообразования. Тем не менее на вегетационной площадке результат оказался достоверно выше. Важно то, что в критический период образования микроспор в конце июля произошло среднесуточное снижение температуры воздуха, ночные/дневные колебания температуры

оказали позитивное воздействие на культуру пыльников риса. Работами других авторов отмечается, что растения, отобранные в полевых условиях, более отзывчивы в андрогенезе *in vitro*, чем тепличные [6, 11, 12]. Таким образом, для успешного культивирования пыльников риса в условиях *in vitro* важно не постоянное создание стрессовых факторов в период микроспорогенеза, а колебания в воздействии индуцирующего фактора. В данном случае для каллусообразования температурные перепады вегетационной площадки имели преимущество перед постоянной низкой температурой культуральной комнаты.

Стоит отметить, что в условиях Приморского края РФ рис находится на северной границе ареала. Многие страны и регионы позиционируют себя как границу нахождения вида в культуре (Казахстан, Краснодарский край и Ростовская область РФ, Хейлундзянская и Дзилинская провинции КНР). Однако особенностью юга Дальнего Востока являются возвратные холода в первой половине лета, что критично для риса. В год исследования этот слабoreгулируемый фактор оказал положительный эффект на андрогенетические ответы *in vitro* гибридов *O. sativa*. Все они имеют в качестве родительских форм районированные сорта (Рассвет, Приозерный 61, Дальневосточный, Дарий 23, Луговой) и коллекционные образцы (Новатор, Хазар, Вираз, Науакэ), произрастающие в более теплом климате, для которых местные перепады температур — стрессовая обработка. Можно допустить, что в тех исследованиях, где использованы полевые растения [6, 11, 12], наблюдалась аналогичная ситуация — колебания абиотических факторов, которые и запускают механизмы отклонения от нормального (типичного) опыления и использования растением резервных способов формирования семян.

Заключение

Условия культивирования растений доноров гибридов риса *O. sativa* на вегетационной площадке позволяют получить в культуре пыльников *in vitro* среднее каллусообразование 10,0%, что выше в два раза по сравнению с выращиванием в культуральной комнате при температуре 20 °С или использованием комбинированного типа условий выращивания. Для повышения андрогенетических ответов растений *in vitro* необходимо использовать не просто благоприятные условия или постоянно действующие стрессовые факторы для вы-

ращивания растений доноров, а колебания абиотических факторов среды.

Литература

1. Гончарова Ю.К., Харитонов Е.М. Генетические основы повышения продуктивности риса: монография. — Краснодар: ФГБНУ ВНИИ риса, Просвещение-Юг, 2015. — 314 с.
2. Илюшко М.В., Ромашова М.В., Гученко С.С. Оценка частоты внутрикалусной изменчивости андрогенных удвоенных гаплоидов риса (*Oryza sativa* L.) по генам устойчивости к пирикуляриозу // Сельскохозяйственная биология. — 2023. — Т. 58. — № 3. — С. 554–566.
3. Илюшко М.В. Эффективность питательных сред при получении регенератов в культуре пыльников риса *in vitro* // Вестник Российской сельскохозяйственной науки. — 2015. — № 4. — С. 60–62.
4. Кириллова Г.А. Явление гаплоидии у покрытосеменных растений // Генетика. — 1966. — № 2. — С. 137–147.
5. Хохлов С.С. Эволюционно-генетическое значение гаплоидии / В кн.: Гаплоидия и селекция. — М.: Наука, 1976. — С. 152–163.
6. Germana M.A. Anther culture for haploid and doubled haploid production // Plant Cell Tiss Organ Cult. — 2011. — Vol. 104. — P. 283–300.
7. Lantos C., Jancso M., Szekely A., Nagy E., Szaloki T., Pauk J. Improvement of anther culture to integrate doubled haploid technology in temperate rice (*Oryza sativa* L.) breeding // Plants. — 2022. — Vol. 11. — Art. 3446. doi: 10.3390/plants11243446.
8. Niazi M., Shariatpanahi E. In vitro-based doubled haploid production: Recent improvements // Euphytica. — 2020. — Vol. 216. — Art. 69. doi: 10.1007/s10681-020-02609.
9. Niizeki B.H., Oono K. Induction of haploid rice plant from anther culture // Proc. Japan Acad. — 1968. — Vol. 44. — P. 554–557.
10. Sahina A., Mir S., Najeeb S., Zargar S.M., Nehvi F.A., Rather Z.A., Salgotra R.K., Shikari A.B. Improved protocol for efficacious *in vitro* androgenesis and development of doubled haploids in temperate japonica rice // PLOS One. — 2020. — Vol. 15(11). — Art. e0241292. doi: 10.1371/journal.pone.0241292.
11. Samantaray S., Dash B., Bhuyan S.S., Chidambaranathan P.C., Katara J.L., Verma R.L., Devanna B.N., Chattopadhyay K., Kumar A., Anandan A. High-frequency androgenic green plant regeneration in indica rice for accelerated breeding // Accelerated Plant Breeding. — 2020. — Vol. 1. — P. 233–255.
12. Sarao N.K., Gosal S.S. In vitro androgenesis for accelerated breeding in rice // Biotechnologies of Crop Improvement. — 2018. — Vol. 1. — P. 407–435.

13. Segui-Simarro J.M., Jacquier N.M.A., Widiez T. Overview of *in vitro* and *in vivo* doubled haploid technologies // Doubled haploid technology. – 2021. – Vol. 1. – P. 3–22.
14. Tajedini S., Fakhen B., Niazian M., Mahdinezhad N., Ghanim A.M.A., Pour A.K., Ingelbrecht I., Shariatpanahi M. Efficient microspore embryogenesis and haploid induction in mutant indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars // Journal of Plant Growth regulation. – 2022. – Vol. 42. – Issue 4. – P. 2345–2359. doi: 10.1007/s00344-022-10709-y.
7. Lantos C, Jancso M, Szekely A, Nagy E, Szaloki T, Pauk J. Improvement of anther culture to integrate doubled haploid technology in temperate rice (*Oryza sativa* L.) breeding. *Plants* 2022; 11:3446. doi: 10.3390/plants11243446.
8. Niazian M, Shariatpanahi E. In vitro-based doubled haploid production: Recent improvements. *Euphytica* 2020; 216:69. doi: 10.1007/s10681-020-02609.
9. Niizeki BH, Oono K. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc Japan Acad* 1968; 44:554–557.
10. Sahina A, Mir S, Najeeb S, Zargar SM, Nehvi FA, Rather ZA, Salgotra RK, Shikari AB. Improved protocol for efficient *in vitro* androgenesis and development of doubled haploids in temperate japonica rice. *PLOS One* 2020; 15(11):e0241292. doi: 10.1371/journal.pone.0241292.
11. Samantaray S, Dash B, Bhuyan SS, Chidambaramathan PC, Katara JL, Verma RL, Devanna BN, Chattopadhyay K, Kumar A, Anandan A. High-frequency androgenic green plant regeneration in indica rice for accelerated breeding. *Accelerated Plant Breeding* 2020; 1:233–255.
12. Sarao NK, Gosal SS. *In vitro* androgenesis for accelerated breeding in rice. *Biotechnologies of Crop Improvement* 2018; 1:407–435.
13. Segui-Simarro JM, Jacquier NMA, Widiez T. Overview of *in vitro* and *in vivo* doubled haploid technologies. *Doubled haploid technology* 2021; 1:3–22.
14. Tajedini S, Fakhen B, Niazian M, Mahdinezhad N, Ghanim AMA, Pour AK, Ingelbrecht I, Shariatpanahi M. Efficient microspore embryogenesis and haploid induction in mutant indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Journal of Plant Growth regulation* 2022; 42(4):2345–2359. doi: 10.1007/s00344-022-10709-y.

References

1. Goncharova YuK, Kharitonov YeM. Geneticheskiye osnovy povysheniya produktivnosti risa: monografiya. Krasnodar: FGB-NU VNII risa, Prosveshcheniye-Yug, 2015: 314 s (in Russian).
2. Ilyushko MV, Romashova MV, Guchenko SS. Otsenka chastoty vnutrikallusnoy izmenchivosti androgennykh udvoennykh gaploidov risa (*Oryza sativa* L.) po genam ustoychivosti k pirikulyariozu. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya* 2023; 58(3):554–566 (in Russian).
3. Ilyushko MV. Effektivnost' pitatel'nykh sred pri poluchenii regeneratov v kul'ture pyl'nikov risa *in vitro*. *Vestnik Rossiyskoy sel'skokhozyaystvennoy nauki* 2015; 4:60–62 (in Russian).
4. Kirillova GA. Yavleniye gaploidii u pokryosemennykh rasstieniy. *Genetika* 1966; 2:137–147 (in Russian).
5. Khokhlov SS. Evolyutsionno-geneticheskoye znachenie gaploidii. V kn: *Gaploidiya i selektsiya*. Moscow: Nauka, 1976:152–163 (in Russian).
6. Germana MA. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2011; 104:283–300.

THE INFLUENCE OF DONOR PLANTS GROWING CONDITIONS ON ANDROGENETIC RESPONSES *IN VITRO* OF *ORYZA SATIVA* L.

M.V. ILYUSHKO

A.K. Chaika Federal Scientific Center of Agricultural Biotechnology of the Far East, Ussuriysk

The growing conditions influence of donor plants on the *Oryza sativa* L. androgenetic responses in anther culture *in vitro* to improve the rice breeding process in the Russian Far East was studied. Four F2 hybrids were used: ([Rassvet × Novator] × Novator); (Novator × [Priozerny 61 × (Dalnevostochniy × Hayakaze)]); (Khazar × Daryi 23); (Lugovoy × Virazh). Seeds of donor plants were sown on May 20 and grown in seedling pots in the summer under three types of conditions: a) in a culture room at a temperature of 20 °C, a photoperiod of 16 hours and illumination of 4000 lux; b) in open space for vegetation until the middle of tillering, followed by transfer to the conditions of the culture room (combined option); c) in open space for vegetation. The growing conditions of donor plants influenced the intensity of callus formation (Kruskal – Wallis test $H=10,36$ at $p=0,06$): in open space 10,0%, when using a culture room and a combined type of cultivation 5,6 and 6,7%, respectively. The intensity of regeneration and the regenerating type were not affected by growing conditions. During the critical period of microspore formation in open space at the end of July, an average daily decrease in air temperature occurred; night/day temperature fluctuations had a positive effect on the rice anther culture. It was concluded that to increase the plants androgenetic responses *in vitro*, it is necessary to use not just favorable conditions or constantly operating stress factors when growing donor plants, but fluctuations in abiotic environmental factors.

Keywords: *Oryza sativa*, androgenesis *in vitro*, growing conditions, callus formation, regeneration.

Address:

Ilyushko M.V., Ph.D. biol. sciences
Associate professor, leading researcher at the laboratory
of agricultural sciences biotechnology, A.K. Chaika Federal
Scientific Center of Agricultural Biotechnology of the Far East
E-mail: ilyushkoiris@mail.ru

Для цитирования:

Илюшко М.В. Влияние условий выращивания растений доноров на андрогенетические ответы *in vitro* *Oryza sativa* L. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2024; 20(1): 22–27.

For citation:

Ilyushko M.V. The influence of donor plants growing conditions on androgenetic responses *in vitro* of *Oryza sativa* L. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(1): 22–27 (in Russian).

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ГЕЛЯ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ С ВВЕДЕНИЕМ В СОСТАВ СОКА *ALOE ARBORESCENS* ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ЕГО В КАЧЕСТВЕ ПЕРСПЕКТИВНОЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ МЯГКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ

М.С. ЖИГАЧЕВА*

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

На настоящий момент заметна тенденция использования натуральных природных компонентов для получения мягких лекарственных форм в медико-биологических приложениях. Это обосновано тем, что такие вещества уже априори оказывают ряд положительных действий на организм человека и животного. Например, некоторые природные полисахариды, в частности альгинат натрия, обладают ранозаживляющими, гемостатическими, противовоспалительными и другими свойствами. С их помощью можно получить устойчивые гелевые матрицы, внутрь которых удастся вводить лекарственные вещества для направленного действия лекарственных средств [7]. Это широко используется в медицине, ветеринарии и косметологии. В работе исследуются ранозаживляющие свойства полученного геля и степень высвобождения метилурацила из гелевой матрицы.

Ключевые слова: альгинат натрия, гелевая матрица, сок алоэ древовидного, ранозаживляющая активность, аллантоин, метилурацил.

Введение

Альгинат натрия представляет собой линейный анионный полисахарид. На данный момент его в основном получают из бурых водорослей [4, 15], в которых содержится в виде солей альгиновой кислоты (D-маннуронозой и L-гулууронозой) [4].

Альгинаты — это сополимеры β -D-маннуронозой (M) и α -L-гулууронозой (G) кислот, соединенных между собой 1,4-гликозидными связями. При этом мономерные звенья могут располагаться как в поочередном порядке, так и блочно, в зависимости от вида и частей водорослей, которые используют для экстракции. Благодаря такому химическому разнообразию данный полимер обладает широким спектром свойств [1]. Молекулярная масса молекул альгинатов также неодинакова и может изменяться даже от партии к партии одного производителя.

Альгинаты характеризуются простым процессом гелеобразования, хорошей биосовместимостью, био-

разлагаемостью, низкой токсичностью, гипоаллергенностью, а также они обладают влагосвязывающими и влагоудерживающими свойствами. Все это позволяет им быть востребованными материалами в разработке и производстве косметических, ветеринарных и медицинских композиций.

При этом сам по себе альгинат натрия не может образовывать устойчивые гели, только загущает системы, что применяется в пищевой, косметической, биотехнологической и других видах промышленности [6, 13]. Чтобы получить гели на основе данного полисахарида, необходимо добавить в раствор двухвалентный катион, например ион Ca^{2+} . В результате он заместит ион Na^+ и образует своеобразные мостики-сшивки между полимерными цепями, связав 2 карбоксильные группы соседних мономерных фрагментов (рис. 1). Иными словами, гелеобразование идет в результате реакции комплексообразования.

Исходя из вышесказанного, раневые покрытия на основе альгината натрия содержат кальциевую соль альгиновой кислоты — альгинат кальция или комбинацию альгината кальция и альгината натрия. По мнению многих исследователей, данный гель представляет собой оптимальную среду для размножения и миграции раневых клеток, чем и объясняются ранозаживляющие свойства альгинатных покрытий. Кроме того, стимулирование неонангиогенеза объясняется и раздражительными свойствами

© 2024 г. Жигачева М.С.

* Автор для переписки:

Жигачева Марина Сергеевна

аспирант 3 года обучения факультета ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий, ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова»

E-mail: Shapkarina.marina@mail.ru

альгината кальция. Альгинат натрия может ускорять регенерацию поврежденных участков ткани и кожи, обволакивая и тем самым защищая от раздражающего действия внешней природы [17]. Альгинат кальция способен модулировать клеточные сигнальные пути, регулируя рост, дифференциацию и функционирование ключевых участников процесса заживления (фибробласты, кератиноциты, макрофаги и эндотелиальные клетки) [9, 12, 19].

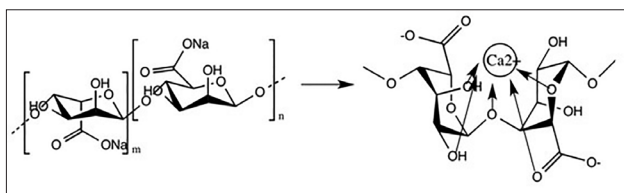


Рис.1. Процесс гелеобразования альгината натрия в присутствии иона Ca^{2+}

Также альгинаты проявляют выраженные абсорбирующие гемостатические свойства. Например, пропитанные ими перевязочные материалы использовались и до сих пор используются для наружного применения и нанесения на места кровотечения при полостных операциях [9, 18].

Тенденция использования растительного сырья в разработках продукции различного применения объясняется тем, что содержащиеся в растениях биологически активные вещества при правильном использовании не вызывают раздражения, аллергических реакций, а также могут проявлять антимикробную активность против организмов, устойчивых к антибиотикам [11]. Такие средства широко применяют для лечения кожных и слизистых заболеваний; при этом долговременная фитотерапия будет практически безопасной, в отличие от препаратов химического происхождения [8, 14].

Для увеличения терапевтического спектра действия препаратов возможно добавление вспомогательных веществ. Они либо усиливают необходимый эффект, либо оказывают действие на другую сторону проблемы, тем самым обеспечивается комплексный подход к уходу за кожей и ее лечению. Сейчас это направление считается популярным в связи с увеличением внимания к «зеленым» ингредиентам в косметологии, в медицине и к сохранению природы земного шара [16, 20]. Еще с давних времен известно, что растительное сырье, например, сок алоэ обладает выраженным ранозаживляющим, противовоспалительным и другими действиями [10].

Ранее нами был получен гель на основе карбоксиметилцеллюлозы и альгината натрия с введением в компонентный состав сока *Aloe arborescens* [2, 3]. Целью

настоящей работы является исследовать ранозаживляющую активность альгинатного геля, а также степень высвобождения активных веществ — метилурацила и аллантина из гелевой матрицы.

Материалы и методы

Исследуемый гель на основе альгината имел следующий состав: вода, альгинат натрия, хлорид кальция, диметилсульфоксид, метилурацил, аллантин, ТВИН-80 и бензиловый спирт. Процесс получения заключался в постепенном добавлении компонентов при интенсивном перемешивании до образования гелевой структуры без нагревания при комнатной температуре. Готовый гель оценивали по органолептическим показателям (консистенция, однородность, запах) и измеряли водородный показатель pH в 10%-ном растворе согласно ГОСТу 29188.2-91 «Метод определения водородного показателя pH».

Степень и скорость высвобождения аллантина и метилурацила определяли *in vitro* методом равновесного диализа через полупроницаемую мембрану М-сел с диаметром пор 14 кДа. Диализ проводили при 35 ± 2 °С следующим образом: 0,5 г исследуемого геля помещали внутрь диализного мешочка, опускали в 100 мл очищенной воды. Пробы отбирали через 10 мин после начала опыта и каждый час в течение суток.

Количественное определение активных веществ в пробах диализата проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-1280 при длине волны 220 и 240 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали дистиллированную воду. После этого методом статистической обработки результатов были рассчитаны искомые величины.

Ранозаживляющую активность исследуемого геля изучали на половозрелых белых крысах массой 250–300 г. Животные содержались на стандартном рационе питания, и работа с ними проводилась в соответствии с руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [14]. Для оценки процесса заживления и эффективности проводимого лечения ежедневно наблюдали за состоянием раны: измеряли размеры раны, отмечали состояние кожных покровов вокруг раны и общее состояние крыс. Лабораторных животных разделили на 3 экспериментальные группы, каждая из которых обрабатывалась отдельным препаратом:

- I — исследуемый гель,
- II — вода для инъекций,

- III — мазь «Пантенол»,

Для получения ран одинакового диаметра металлический стержень ($d=10$ мм) нагревали путем выдерживания его в кипящей воде не менее 10 мин. После этого на уже заранее выбритый участок кожи крыс в области грудной клетки с левой стороны прикладывали стержень на 20 сек. Предварительно вводили животных в ингаляционный наркоз с помощью эфира — изофлуран (рис. 2).



Рис. 2. Рана сразу после прекращения воздействия металлическим стержнем

После прекращения воздействия рану обрабатывали и крыс возвращали в свои клетки. Наблюдение осуществлялось ежедневно до полного заживления и заключалось в измерении линейкой пораженного участка с последующей местной обработкой путем нанесения препаратов на раневую поверхность один раз в день.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием Microsoft Excel 2010.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного диализа установлено, что уже после 5 ч высвобождается больше 60% массы активных веществ, а после 24 ч — более 80%. Это показывает эффективное высвобождение веществ из матрицы геля.

Во всех группах животных на следующие сутки после получения ожога была отмечена сильная гиперемия. В последующие несколько дней происходило образование темно-красной грануляционной ткани с характерной зернистой структурой (рис. 3). Однако стоит отметить, что рана у I группы крыс имела большую площадь и степень поражения, вероятнее всего связанные с человеческим фактором. Для наиболее визуального сравнения положительного контроля и исследуемого геля далее будут указаны результаты по группам I и III.

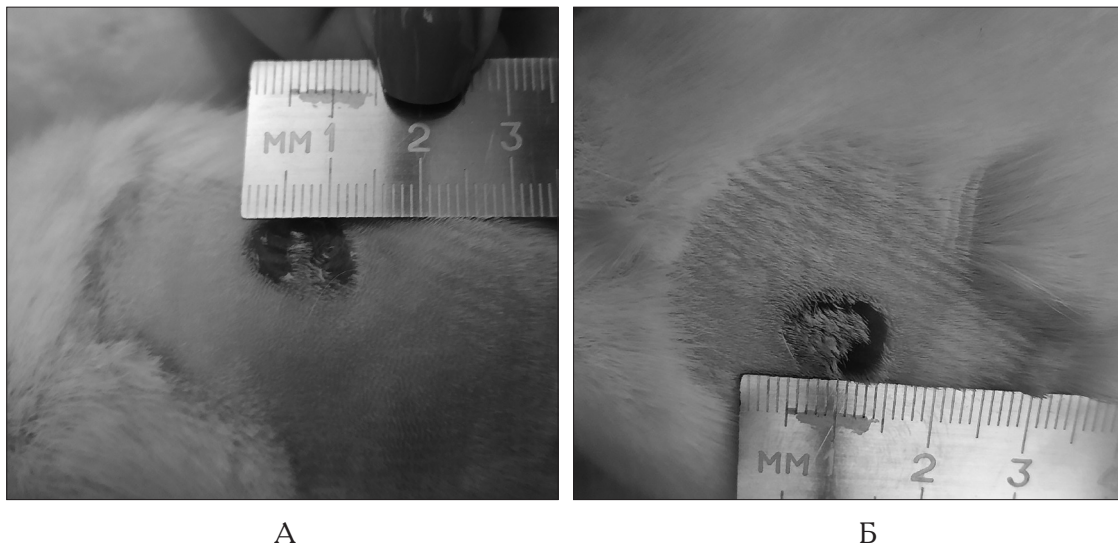


Рис. 3. Рана на 2-е сутки: А — обработанная исследуемым гелем, Б — обработанная мазью «Пантенол»

На 5-й день у группы, которая обрабатывалась исследуемым гелем, образовывался струп (корка), в то время как у группы, обрабатываемой мазью «Пантенол», это происходит на день-два позже. На 16-й день у группы III корка слезла, а у группы I это происходило на 18-й день с сохранением раневой поверхности, но

меньшего размера. Полное заживление ожога было отмечено на 23-е сутки у группы I и на 25-е сутки у группы III, что говорит о сокращении срока заживления ран при использовании геля на основе альгината натрия. Сравнение полученных результатов представлено на рисунке 4 и в таблице 1.

Результаты измерения раны

| День | Размеры раны, мм | |
|-------|-----------------------------|----------------|
| | I группа (Исследуемый гель) | III (Пантенол) |
| I | 10×10 | 10×10 |
| II | 13×13 | 11×11 |
| III | 15×13 | 13×13 |
| IV | 15×13 | 13×13 |
| VI | 15×12 | 11×11 |
| VIII | 15×12 | 11×11 |
| IX | 15×12 | 11×11 |
| X | 15×12 | 11×11 |
| XI | 15×12 | 10×10 |
| XII | 14×10 | 10×10 |
| XIII | 13×8 | 9×9 |
| XIV | 13×8 | 7×8 |
| XVI | 12×8 | 3×4 |
| XVIII | 3×3 | 2×2 |
| XXI | 1×1 | 1×1 |
| XXIII | Раны нет | 1×1 |



А



Б

Рис. 4. Рана на 23-сутки: А – обработанная исследуемым гелем, Б – обработанная пантенолом

Заключение

На основании проведенного исследования сделаны выводы:

1. В результате диализа было определено эффективное высвобождение метилурацила и аллантаина из гелевой матрицы.

2. При сравнении результатов лечения ожоговых ран исследуемый гель оказался более эффективен, чем мазь «Пантенол», учитывая первоначально большую площадь и степень поражения кожи у крыс. Это позволяет сделать вывод о его применении в качестве перспективного ранозаживляющего средства.

Литература

1. *Верещагин А.Л., Морозова Е.А.* Химия и технология наполненных гидрогелей для создания альгинатных косметических масок (обзор) // Южно-Сибирский научный вестник. — 2020. — № 5(33). — С. 12–31.
2. *Жигачева М.С.* Получение косметического геля на основе растительного сырья и изучение его антимикробной активности в отношении ряда микроорганизмов // «Фундаментальные аспекты и практические вопросы современной микробиологии и биотехнологии»: материалы Национальной научно-практической конференции с международным участием, посвященной 70-летию со дня рождения доктора биологических наук, профессора, Почетного работника высшего профессионального образования РФ, Заслуженного деятеля науки и техники Ульяновской области Дмитрия Аркадьевича Васильева, 29 сентября 2022 года / Министерство сельского хозяйства Российской Федерации [и др.]; редкол.: Богданов И.И. [и др.]. — Ульяновск: ГАУ, 2022. — С. 570–575.
3. *Жигачева М.С.* Разработка медико-косметического геля на основе альгината натрия // Аграрная наука-2022: Сб. статей Всероссийской конференции молодых исследователей 22–24 ноября 2022 г. / под ред. В.И. Трухачева, А.В. Шитиковой. — М.: Изд-во РГАУ – МСХА, 2022. — С. 653–655.
4. *Запорожец Е.Ю., Нугманов А.Х.* Перспективы получения альгината натрия из бурых водорослей Каспийского моря // Нефтегазовые технологии и экологическая безопасность. — 2022. — № 2(74). — С. 48–53.
5. *Захарова В.А., Фидоровская Ю., Хлыстова Т.С., Кильдеева Н.Р.* Производные альгиновой кислоты: особенности строения, свойства и перспективы использования в медицине // Промышленные процессы и технологии. — 2022. — Т. 2. — № 5. — С. 64–79.
6. *Ковальская Г.Н., Михалевич Е.Н., Колмакова Е.С.* Гели как лекарственная форма в государственной фармакопее XIV издания, нормативно-правовых актах Минздрава России и государственном реестре лекарственных средств // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. — 2020. — № 1(27). — С. 76–85.
7. *Кочеткова Н.А., Чуйкова Н.А.* Перспективы применения растительного сырья для получения биологически активных соединений в ветеринарной медицине // Актуальные вопросы сельскохозяйственной биологии. — 2021. — № 4(22). — С. 39–52.
8. *Кудряшова И.С., Марков П.А., Костромина Е.Ю.* Разработка раневых покрытий для регенеративной медицины // Вестник восстановительной медицины. — 2021. — Т. 20. — № 6. — С. 84–95.
9. *Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия: учебное пособие по фармакогнозии для студентов фармацевтических вузов, обучающихся по специальности «Фармация» / ред.: Г.П. Яковлев, К.Ф. Блинова. — СПб.: СпецЛит, 2004. — 765 с.*
10. *Леонова М.В., Климошкин Ю.Н.* Экстракционные методы изготовления лекарственных средств из растительного сырья: учебно-методическое пособие. — Самара: Самар. гос. техн. ун-т. 2012. — 111 с.
11. *Морозов А.М., Сергеев А.Н., Сергеев Н.А. и др.* Использование современных раневых покрытий в местном лечении ран различной этиологии // Современные проблемы науки и образования. — 2020. — № 2. — С. 167–175.
12. *Ногаева У.В., Наумова А.А., Новиньков А.Г., и др.* Сравнительное изучение реологических свойств гелей и кремов на различных основах-носителях // Разработка и регистрация лекарственных средств. — 2022. — № 11(3). — С. 121–129.
13. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А.Н.Миронов, Н.Д. Бунатян и др. — М.: Гриф и К, 2012. — Ч. 1. — 944 с.*
14. *Соколан Н.И., Куранова Л.К., Воронько Н.Г., Гроховский В.А.* Исследование возможности получения альгината натрия из продукта переработки фукусовых водорослей // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. — 2018. — Т. 80. — № 1. — С. 161–167.
15. *Сёмкина О.А.* Мази, гели, линименты и кремы, содержащие фитопрепараты (обзор) // Методы синтеза и технология производства лекарственных средств // Химико-фармацевтический журнал. — 2005. — Т. 39. — № 7. — С. 30–36.
16. *Фетисова В.Э., Тетерина А.Ю., Баранов О.В. и др.* Двухслойные матриксы на основе альгината натрия с антибактериальными свойствами для замещения кожных покровов / Химия, физика, биология: пути интеграции: Сб. тез. докладов VIII Всероссийской научной молодежной школы-конференции. — М.: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук. — 2020. — С. 64.

17. Фидоровская Ю.С., Швыдкова Д.А., Медушева Е.О. Создание лечебных материалов на основе природных полимеров с использованием растительных протеиназ / Физика волокнистых материалов: структура, свойства, наукоемкие технологии и материалы: Сб. материалов XXIII Междунар. науч.-практ. форума «SMARTEX-2020», 20–23 октября 2020 года. — Иваново: ИВГПУ, 2020. — С. 421–426.
18. Швецов И.С. Аппликационные гемостатические средства. Возможности и перспективы альгината натрия и хитозана // Клиническая медицина. — 2021. — № 5. — С. 230–235.
19. Gozhenko A.I., Levitsky A.P., Stepan V.T., Selivanskaya I.A., Pustovoit I.P. Comparative nephroprotective efficiency of polyfunctional mucous-adhesive phytogels // Journal of Education, Health and Sport. — 2021. — Vol. 11. — No.1. — P. 24–32.

References

1. Vereshchagin AL, Morozova YeA. Khimiya i tekhnologiya napolnennykh gidrogeley dlya sozdaniya al'ginatnykh kosmeticheskikh masok (obzor). Yuzhno-Sibirskiy nauchnyy vestnik 2020; 5(33):12–31 (in Russian).
2. Zhigacheva MS. Polucheniye kosmeticheskogo gelya na osnove rastitel'nogo syr'ya i izucheniye yego antimikrobnoy aktivnosti v otnoshenii ryada mikroorganizmov. «Fundamental'nyye aspekty i prakticheskiye voprosy sovremennoy mikrobiologii i biotekhnologii»: materialy Natsional'noy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem, posvyashchennoy 70-letiyu so dnya rozhdeniya doktora biologicheskikh nauk, professora, Pochetnogo rabotnika vysshogo professional'nogo obrazovaniya RF, Zasluzhennogo deyatelya nauki i tekhniki Ul'yanskovskoy oblasti Dmitriya Arkad'yevicha Vasil'yeva, 29 sentyabrya 2022 goda. Ministerstvo sel'skogo khozyaystva Rossiyskoy Federatsii [i dr]; redkol: Bogdanov II [i dr]. Ul'yanskovsk: GAU, 2022: 570–575 (in Russian).
3. Zhigacheva MS. Razrabotka mediko-kosmeticheskogo gelya na osnove al'ginata natriya. Agrarnaya nauka-2022: Сб. statey Vserossiyskoy konferentsii molodykh issledovateley 22–24 noyabrya 2022 g. pod red VI Trukhacheva, AV Shitikovoy. Moscow: Izd-vo RGAU: MSKHA, 2022: 653–655 (in Russian).
4. Zaporozhets Ye Yu, Nugmanov AKh. Perspektivy polucheniya al'ginata natriya iz burykh vodorosley Kaspiyskogo morya. Neftegazovyye tekhnologii i ekologicheskaya bezopasnost' 2022; 2(74):48–53 (in Russian).
5. Zakharova VA, Fidorovskaya YU, Khlystova TS, Kil'deyeva NR. Proizvodnyye al'ginovoy kisloty: osobennosti stroyeniya, svoystva i perspektivy ispol'zovaniya v meditsine. Promyshlennyye protsessy i tekhnologii 2022; 2(5):64–79 (in Russian).
6. Koval'skaya GN, Mikhalevich YeN, Kolmakova YeS. Geli kak lekarstvennaya forma v gosudarstvennoy farmakopeye XIV izdaniya, normativno-pravovykh aktakh Minzdrava Rossii i gosudarstvennom reyestre lekarstvennykh sredstv. Voprosy obespecheniya kachestva lekarstvennykh sredstv 2020; 1(27):76–85 (in Russian).
7. Kochetkova NA, Chuykova NA. Perspektivy primeneniya rastitel'nogo syr'ya dlya polucheniya biologicheskii aktivnykh soyedineniy v veterinarnoy meditsine. Aktual'nyye voprosy sel'skokhozyaystvennoy biologii 2021; 4(22):39–52 (in Russian).
8. Kudryashova IS, Markov PA, Kostromina Ye Yu. Razrabotka ranevykh pokrytiy dlya regenerativnoy meditsiny. Vestnik vosstanovitel'noy meditsiny 2021; 20(6):84–95 (in Russian).
9. Lekarstvennoye rastitel'noye syr'ye. Farmakognoziya: uchebnoye posobiye po farmakognozii dlya studentov farmatsevticheskikh vuzov, obuchayushchikhsya po spetsial'nosti «Farmatsiya». Red: GP Yakovlev, KF Blinova. St. Petersburg: SpetsLit, 2004: 765 (in Russian).
10. Leonova MV, Klimochkin YuN. Ekstraktsionnyye metody izgotovleniya lekarstvennykh sredstv iz rastitel'nogo syr'ya: uchebno-metodicheskoye posobiye. Samara: Samar gos tekhn un-t. 2012: 111 (in Russian).
11. Morozov AM, Sergeyev AN, Sergeyev NA i dr. Ispol'zovaniye sovremennykh ranevykh pokrytiy v mestnom lechenii ran razlichnoy etiologii. Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya 2020; 2:167–175 (in Russian).
12. Nogayeva UV, Naumova AA, Novin'kov AG, i dr. Sravnitel'noye izucheniye reologicheskikh svoystv geley i kremov na razlichnykh osnovakh-nositelyakh. Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv 2022; 11(3):121–129 (in Russian).
13. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv pod red ANMironov, ND Bunatyan i dr. Moscow: Grif i K, 2012; Ch 1: 944 (in Russian).
14. Sokolan NI, Kuranova LK, Voron'ko NG, Grokhovskiy VA. Issledovaniye vozmozhnosti polucheniya al'ginata natriya iz produkta pererabotki fukusovykh vodorosley. Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta inzhenernykh tekhnologiy 2018; 80(1):161–167 (in Russian).
15. Syomkina OA. Mazi, geli, linimenty i kremy, sodержashchiye fitopreparaty (obzor). Metody sinteza i tekhnologiya proizvodstva lekarstvennykh sredstv. Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal 2005; 39(7):30–36 (in Russian).
16. Fetisova VE, Teterina AYU, Baranov OV i dr. Dvukhsloynnyye matriksy na osnove al'ginata natriya s antibakterial'nymi svoystvami dlya zameshcheniya kozhnykh pokrovov. Khimiya, fizika, biologiya: puti integratsii: Sb tez dokladov VIII Vserossiyskoy nauchnoy molodezhnoy shkoly-konferentsii. Moscow: Federal'noye gosudarstvennoye byudzhethnoye uchrezhdeniye nauki Institut khimicheskoy fiziki im NN Semenova Rossiyskoy akademii nauk 2020: 64 (in Russian).

17. Fidorovskaya YuS, Shvydkova DA, Medusheva YeO. Sozdaniye lechebnykh materialov na osnove prirodnykh polimerov s ispol'zovaniyem rastitel'nykh proteinaz. Fizika voloknistykh materialov: struktura, svoystva, naukoymkiye tekhnologii i materialy: Sb materialov KHXIII Mezhdunar. nauch.-prakt. foruma «SMARTEX-2020», 20–23 oktyabrya 2020 goda. Ivanovo: IVGPU, 2020: 421–426 (in Russian).
18. Shvetsov IS. Applikatsionnyye gemostatichekiye sredstva. Vozmozhnosti i perspektivy al'ginata natriya i khitozana. Klinicheskaya meditsina 2021; 5:230–235 (in Russian).
19. Gozhenko AI, Levitsky AP, Stepan VT, Selivanskaya IA, Pustovoit IP. Comparative nephroprotective efficiency of polyfunctional mucous-adhesive phytogels. Journal of Education, Health and Sport 2021; 11(1):24–32.

STUDYING THE PROPERTIES OF A GEL BASED ON SODIUM ALGINATE WITH THE INTRODUCTION OF *ALOE ARBORESCENS* JUICE TO THE COMPOSITION FOR ITS APPLICATION AS A PROMISING BIOLOGICALLY ACTIVE SOFT DOSAGE FORM

M.S. ZHIGACHEVA

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

Currently, there is a noticeable trend in using natural ingredients to obtain soft dosage forms in biomedical applications. This is justified by the fact that such substances already a priori have a number of positive effects on the human and animal body. For example, some natural polysaccharides, in particular sodium alginate, have wound healing, hemostatic, anti-inflammatory and other properties. Using them, it is possible to obtain stable gel matrices, into which it is possible to introduce medicinal substances for the targeted action of drugs [7]. It is widely used in medicine, veterinary medicine and cosmetology. The work examines the wound-healing properties of the obtained gel and the degree of release of methyluracil from the gel matrix.

Keywords: sodium alginate, gel matrix, *Aloe arborescens* juice, wound healing activity, allantoin, methyluracil.

Address:

Zhigacheva M.S.

3rd year postgraduate student of the Faculty of veterinary medicine,

food and biotechnology, Saratov State University of Genetics,

Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov

E-mail: Shapkarina.marina@mail.ru

Для цитирования:

Жигачева М.С. Изучение свойств геля на основе альгината натрия с введением в состав сока *Aloe arborescens* для применения его в качестве перспективной биологически активной мягкой лекарственной формы. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2024; 20(1):28–34.

For citation:

Zhigacheva M.S. Studying the properties of a gel based on sodium alginate with the introduction of *Aloe arborescens* juice to the composition for its application as a promising biologically active soft dosage form. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(1):28–34 (in Russian).

РАЗРАБОТКА И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КРЕМНЕЗЁМНЫХ МАГНОИММУНОСОРБЕНТОВ ТУЛЯРЕМИЙНЫХ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

А.С. ГЕОГДЖАЯН*, И.В. ЖАРНИКОВА, А.А. СЕМИРЧЕВА,
Д.В. РУСАНОВА, В.М. ДУБЯНСКИЙ

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь

В настоящее время остается актуальной проблема разработки магнитовосприимчивых сорбентов, обладающих селективными свойствами, для концентрирования возбудителей особо опасных инфекций с последующей индикацией в серологических анализах. Цель исследования — разработка и сравнительная характеристика кремнезёмных магноиммуносорбентов туляремийных при постановке иммуноферментного анализа. В работе использовали физико-химические, бактериологические, серологические, статистические методы исследования. Кремнезёмные магносорбенты получали на основе оксида железа (II), аэросила, полисорба МП, с/без активирования матриц реополиглобулином и поверхностно-активным веществом. В процессе исследований было разработано и проанализировано 7 вариантов магнитных иммуносорбентов с различной чувствительностью в ИФА: в варианте с прокаливанием — 1×10^5 м.к./мл; с длительным периодом гелеобразования (12–18 час) и измельчением сорбентов — 1×10^5 – 1×10^4 м.к./мл; без прокалывания, измельчения — 1×10^4 – 1×10^3 м.к./мл. Варианты с полисорбом МП и с аэросилом показали чувствительность в ИФА — 1×10^4 – 1×10^3 м.к./мл. Полагают, что эффективность применения аэросила, полисорба МП для конструирования кремнезёмных магноиммуносорбентов с последующей постановкой ИФА аналогична. При разработке препаратов необходимо исключить процесс прокалывания магносорбентов, так как снижается чувствительность ИФА. Применение ПАВ — лаурилсульфата натрия — оказало положительное влияние на показатели магноиммуносорбентов при использовании данной технологии, что отразилось в более высокой чувствительности ИФА.

Ключевые слова: кремнезёмные магносорбенты; магноиммуносорбенты; иммуноферментный анализ; *Francisella tularensis*, оксид железа, аэросил, полисорб МП.

Введение

В последнее время интенсивно ведутся работы по синтезу магнитных сорбентов для решения задач биологии, экологии, ветеринарии и медицины. Одним из основных преимуществ магнитовосприимчивых сорбентов по сравнению с обыкновенными (не магнитными) является наличие магнетизма, с помощью которого ими можно управлять при наложении внешнего магнитного поля [11].

Наиболее перспективное направление использования магнитных сорбентов — разработка носителей, обладающих селективными свойствами для аффинной сорбции патогенов на иммуносорбенте, что позволяет увеличивать

выявляемость возбудителя инфекционных заболеваний. Это особенно актуально при исследовании загрязнённых проб большого объёма и с низкой концентрацией патогенов, поскольку выявить возбудитель традиционными методами в данных объектах практически невозможно.

Использование магнитных сорбентов повышает уровень специфической активности и специфичности препаратов, тем самым увеличивая надёжность и достоверность эпидемиологического обследования объектов внешней среды на содержание инфекционных агентов, в том числе возбудителей особо опасных инфекций [7].

Цель исследования — разработка и сравнительная характеристика кремнезёмных магноиммуносорбентов туляремийных при постановке иммуноферментного анализа.

Материалы и методы

В работе использовали физико-химические, бактериологические, серологические, статистические методы исследования.

© 2024 г. Геогджаян А.С., Жарникова И.В., Семирчева А.А., Русанова Д.В., Дубянский В.М.

* Автор для переписки:

Геогджаян Анна Самвеловна

научный сотрудник научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, E-mail: annageogjayan@yandex.ru

Кремнезёмные магносорбенты (КМС) получают на основе оксида железа (II), аэросила, полисорба МП, с/без модифицирования матриц реополиглюкином (10%-ный раствор декстрана), с/без активирования поверхностно активным веществом (ПАВ) с последующей иммобилизацией белкового лиганда (антител туляреминых).

В работе использовали оксид железа (II) (ГОСТ Р 53657-2009, АО «Вектон», Санкт-Петербург); аэросил А-380 (ГОСТ 14922-77, ООО «РоссПолимер», Москва); полисорб МП (Р 001140/01, АО «Полисорб», Челябинская область, г. Копейск); реополиглюкин — 10%-ный раствор декстрана (декстран со средней молекулярной массой 30000–40000) (ООО «Максфарм», Москва); ПАВ — лаурилсульфат натрия ТУ 6-09-64-75 (ООО «Вита Хим», Казань).

Для иммобилизации КМС с целью получения кремнезёмных магноиммуносорбентов (КМИС) применяли сыворотку диагностическую туляреминую сухую для реакции агглютинации по ТУ 8852-003-01898090-2010 (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора).

Иммуноферментный анализ (ИФА) с КМИС осуществляли в пробирках микроцентрифужных (Эппендорф) 1,5 мл (ООО «МиниМед», Россия), используя магнитный штатив DynaMag-2 («Invitrogen Dynal AS», Норвегия). В качестве твердой основы применяли КМИС с иммобилизованными туляремиными антителами.

Для постановки ИФА использовали тест-систему производства ФКУЗ Ставропольский противочумный институт. В состав тест-системы входят: иммунопероксидазный конъюгат туляреминый; положительный контрольный образец сухой (K^+), представляющий собой обеззараженную взвесь *F. tularensis* 15 НИИЭГ в концентрации 1×10^9 м.к./мл; фосфатно-солевой буфер (сухая навеска); твин 20; бычий сывороточный альбумин (БСА) («Диаэм», Россия); тетраметилбензидин (ТМБ) (ЗАО «НВО Иммунотех», Россия) и стоп-реагент (4 N раствор серной кислоты ГОСТ 2184-2013).

Постановку ИФА осуществляли поэтапным внесением следующих компонентов: взвеси *F. tularensis* 15 НИИЭГ, иммунопероксидазного туляреминого конъюгата, с промывкой на каждом этапе для освобождения от несвязавшихся компонентов. Заключительными этапами являлось внесение хромагена — ТМБ и стоп-реагента. Измерения оптической плотности проводили на фотометре «Multiskan FC» (Thermo Fisher Scientific Inc., Финляндия) при длине волны 450 нм, используя

полистироловые планшеты для ИФА (ОАО «Фирма Медполимер», Россия). Результат считали положительными при превышении оптической плотности опытного образца над контрольным (без контакта с антигеном) в 2 и более раза.

Статистический анализ данных проводился с использованием программы Past, 4.03. Для оценки различий между группами был использован U-критерий Манна — Уитни.

Результаты и обсуждение

В качестве магнитной составляющей использовали оксид железа (II). Это типичный основной оксид, обладающий магнитными свойствами, механической прочностью, коррозионной устойчивостью в жидких средах, высокой стабильностью, способностью к сорбции. Кроме магнитных свойств, необходима высокая адсорбционная активность сорбентов. Для этого применяли неорганический кремнезёмный носитель — аэросил А-380, позволяющий получать химически чистые сорбенты, имеющие жёсткий остов, обладающие значительной адсорбционной ёмкостью, микробиологической устойчивостью, механической прочностью. Это — аморфный непористый высокодисперсный, высокоактивный, пиро-генный диоксид кремния (SiO_2), получаемый пламенным гидролизом четырёххлористого кремния ($SiCl_4$) высокой чистоты. Очень лёгкий микронизированный порошок шаровидной формы с выраженными адсорбционными свойствами. Кроме того, развитая удельная поверхность аэросила дает возможность получать композиты с высоким содержанием биологически активных веществ. Наличие силанольных групп на поверхности кремнезёмов обеспечивает возможность их функционализации [8].

Для сравнения применяли полисорб МП, который является препаратом на основе высокодисперсного кремнезёма. В водной среде на поверхности микрочастиц полисорба МП образуется большое количество активных групп силоксана. Полисорб МП обладает сорбционными, антиоксидантными свойствами [6, 9]. Полисорб МП снижает гигроскопичность и используется для создания матриц [4].

В качестве модификатора магнитной матрицы в некоторых вариантах применяли декстран (реополиглюкин). Нами также были апробированы варианты получения КМС с образованием гидрогеля и сухого порошка.

Механизм образования пористого КМС в присутствии реополиглюкина сопровождался формированием корпускулярной структуры кремнезёмного скелета из

частиц аэросила (в другом варианте, полисорб МП) с включением в данный остов полимера (декстрана) за счёт многоточечной адсорбции на катионообменных центрах поверхности кремнезёмного носителя. Дополнительный компонент синтеза КМС, магнитный порошок, способствовал усилению срастания глобул в участки сплошной непористой массы за счет дегидратационных процессов с участием силанольных групп $-\text{Si}-\text{OH}$. Для системы $\text{SiO}_2-\text{Fe}_2\text{O}_3$ механизм адсорбции на кремнезёме может быть представлен схемой, предложенной Р.К. Айлером, 1982 [1], согласно которой первой стадией сорбции является образование гидроксированного комплекса $[\text{Si}-\text{OH}\dots\text{Fe}(\text{OH})_2]^+$. Этот комплекс далее образует более прочные соединения, например $[\text{Si}-\text{O}-\text{Fe}(\text{OH})_2]$. Адсорбция ионов железа на поверхности кремнезёма обуславливает стабилизацию последнего, то есть препятствует прохождению свойственных ему процессов конденсации и полимеризации.

Ионы металлов в металлопротеинах несут двойную функцию: первая из них — ориентировочный или матричный эффект, а вторая — эффект концентрирования (нуклеофила) на участке протекания реакции. Ион металла может образовывать множество связей с субстратом и оттягивать на себя их электронную плотность; таким образом, он ведёт себя как сверхкислота. Сам пептид имеет слабо-жесткую структуру и не обладает каталитическими свойствами. Если ион металла связан с пептидом, то последний приобретает активность, благодаря эффекту оттягивания электронной плотности положительно заряженными электронами металла [2]. Таким образом, введение в структуру кремнезёмов магнитного материала повышает его специфическую активность, упрощает и ускоряет ИФА.

Для получения КМИС проводили иммобилизацию КМС с антителами туляремиными физическим способом (прямая иммобилизация без дополнительных реагентов) и с использованием анионного ПАВ — лаурилсульфата натрия. При этом на поверхности частиц образуется мономолекулярный адсорбционный слой, препятствующий сближению частиц, так как определяющим фактором агрегативной и магнитной устойчивости является расстояние между частицами, которое определяет величину их молекулярного и магнитного взаимодействия. Необходимо также, чтобы потенциальная энергия адсорбционных слоёв ПАВ была больше молекулярного и магнитного взаимодействия частиц, а его толщина такова, чтобы силы притяжения между стабилизирующими частицами ПАВ были меньше энергии их броуновского движения [3]. В связи с этим подобрана

оптимальная концентрация лаурилсульфата натрия. ПАВ, растворяясь в воде, образуют мицеллы, которые благодаря гидрофобности, связывают мономерные формы поверхностных белков. В результате образуются структуры, напоминающие пчелиные соты [10]. Изменяется характер распределения заряда в молекуле, эффективность внутри и межмолекулярного переноса энергии возбуждения электрона, межфазного распределения частиц, растворимость и состояние равновесия реакций. В итоге значительно оптимизируются электрохимические параметры и, как следствие, растёт чувствительность и улучшается селективность аналитических определений [5]. ПАВ обеспечивают эффективное действие, намного превышающее эффективность исходных белков. Тогда прочность связи антител с КМС повышается за счёт создания дополнительных связей, которые образуются между активными группами белка, реополиглокина и лаурилсульфат натрия. В частности, хемосорбция последнего возможна при взаимодействии с аминогруппами белка. В процессе исследований было приготовлено и проанализировано 7 вариантов магнитных сорбентов в десяти повторностях.

КМС по варианту № 1 готовили следующим образом: 1 г полисорб МП растворяли в 20 мл дистиллированной воды и вносили 1 г FeO , тщательно перемешивали. В полученный состав добавляли 5%-ный раствор реополиглокина. Перемешивали и проводили гелеобразование 12–18 ч при температуре 22 ± 4 °С. Далее разливали гель в фарфоровые чашки и прокаливали в течение 20–30 мин при температуре 100–110 °С, измельчали и методом отсева выделяли фракции с размером частиц до 14 мкм.

КМС по варианту № 2 готовили аналогично вышеописанному, но без реополиглокина и не прокаливали, а оставляли при температуре 24 ± 2 °С до полного высыхания (38–48 ч). Далее просеивали, получая частицы с размером до 14 мкм.

КМС по варианту № 3 получали с использованием аэросила вместо полисорба МП и не прокаливали. Далее, как в варианте № 2.

КМС варианта № 4 готовили аналогично варианту № 1, только увеличивали количество полисорба МП в 1,5 раза и не прокаливали. Далее, как в варианте № 2.

КМС вариантов № 5, 6 и 7 получали аналогично вариантам 2, 3 и 1 соответственно, только инкубировали в течение 12–18 ч, пропускали через шприц с иглой и промывали 0,1 М раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ) с рН 7,2–7,4.

Приготовление КМИС с предварительной активацией сыворотки заключалось в следующем: к 1

мл туляремийной сыворотки с концентрацией белка 12 мг/мл вносили 0,025 мл ПАВ на 30 мин при температуре 37 °С, далее добавляли 1 мл 1%-ной взвеси КМС.

При приготовлении КМИС без активации: к 1 мл сыворотки с такой же концентрацией белка вносили 1%-

ной взвеси КМС. Инкубировали 12–18 ч при температуре 24 ± 2 °С и отмывали от несвязавшихся антител 10 раз 0,1 М раствором ФСБ с рН 7,2–7,4.

Варианты получения КМС, КМИС и чувствительность ИФА представлены в таблице 1.

Таблица 1

Варианты получения туляремийных КМС, КМИС и чувствительность КМИС в ИФА

| Вариант | Состав КМС | Активация | Чувствительность, м.к./мл |
|---------|---|---------------|---------------------------|
| В-1 | FeO, раствор полисорб МП, раствор реополиглобулина. С прокаливанием | Без активации | 1×10^5 |
| | | Активация ПАВ | 1×10^4 |
| В-2 | FeO, раствор полисорб МП. Сушка на воздухе, без прокаливании | Без активации | 1×10^5 |
| | | Активация ПАВ | 1×10^4 |
| В-3 | FeO, раствор аэросила. Сушка на воздухе, без прокаливании | Без активации | 1×10^5 |
| | | Активация ПАВ | 1×10^4 |
| В-4 | FeO, раствор полисорба МП в 1,5 раза больше, чем в варианте № 1, раствор реополиглобулина. Сушка на воздухе, без прокаливании | Без активации | 1×10^4 |
| | | Активация ПАВ | 1×10^3 |
| В-5 | FeO, раствор полисорб МП. Без сушки и прокаливании | Без активации | 1×10^4 |
| | | Активация ПАВ | 1×10^3 |
| В-6 | FeO, раствор аэросила. Без сушки и прокаливании. | Без активации | 1×10^4 |
| | | Активация ПАВ | 1×10^3 |
| В-7 | FeO, раствор полисорб МП, раствор реополиглобулина. Без сушки и прокаливании. | Без активации | 1×10^4 |
| | | Активация ПАВ | 1×10^3 |

Как следует из таблицы 1, варианты различаются по чувствительности между активированными и неактивированными ПАВ, при этом чувствительность активированных ПАВ достоверно выше ($p < 0,05$).

Длительный период инкубации, измельчение КМС вариантов 2 и 3 привели к получению КМИС с чувствительностью $1 \times 10^5 - 1 \times 10^4$ м.к./мл. В варианте № 4 отсутствовал процесс прокаливании, измельчения и добавлено в 1,5 раза больше полисорба МП, чем в варианте № 1. Это позволило достичь чувствительности ИФА $1 \times 10^4 - 1 \times 10^3$ м.к./мл. Варианты 5 и 6 по чувствительности ИФА идентичны – $1 \times 10^4 - 1 \times 10^3$ м.к./мл. Таким образом, возможно применение данных кремнезёмов для конструирования КМС. Вариант № 7 отличался от варианта № 1 отсутствием прокаливании и измельчения, но это способствовало получению КМИС с чувствительностью в ИФА $1 \times 10^4 - 1 \times 10^3$ м.к./мл.

Чувствительность КМИС в ИФА, с применением ПАВ для активации поверхности, увеличилась в 10 раз. Вероятно, это связано с тем, что солубилизация (с применением лаурилсульфат натрия) изменяет гидрофобные свойства белков, гидратацию, «жесткость» и конформацию молекул, а вследствие этого целый ряд физико-химических, электрохимических и адсорбционных свойств. В результате значительно оптимизируются

электрохимические параметры и, как следствие, растет чувствительность аналитических определений.

Солубилизация веществ в микрофазе организованной системы существенно изменяет их гидрофобные свойства, гидратацию, «жесткость» и конформацию молекул, а вследствие этого целый ряд физико-химических, спектроскопических, электрохимических и адсорбционных свойств. Изменяется характер распределения заряда в молекуле, эффективность внутри- и межмолекулярного переноса энергии возбуждения и электрона, межфазное распределение частиц, растворимость, скорость, направление и состояние равновесия аналитических реакций [5].

Заключение

Таким образом, проделанная работа позволяет считать, что разработаны кремнезёмные магнитные сорбенты и на их основе – иммуносорбенты с иммобилизованными туляремийными антителами. Определена чувствительность КМИС в ИФА в зависимости от технологических параметров и проведён сравнительный анализ. В результате установлено, что эффективность применения аэросила и полисорба МП для конструирования КМИС с последующей постановкой ИФА практически аналогична (варианты 5 и 6). Применение

в качестве ПАВ лаурилсульфата натрия оказало положительное влияние на показатели КМИС, при применении данной технологии, что отразилось в более высокой чувствительности ИФА во всех вариантах — 1×10^3 м.к./мл.

Использование нетоксичных отечественных компонентов, их дешевизна, простота изготовления, химическая прочность, высокая аналитическая чувствительность ИФА свидетельствуют о достоинствах разработанных КМИС.

Литература

1. Айлер Р. Химия кремнезема: растворимость, полимеризация, коллоидные и поверхностные свойства, биохимия в 2 частях. Пер. с англ. Л.Т. Журавлева / Под ред. В.П. Прянишникова. — М.: Мир, 1982. — 416 с.
2. Дюга Г., Пенни К. Биоорганическая химия. — М.: Мир, 1983. — С. 348–352.
3. Ланге К.Р. Поверхностно-активные вещества: синтез, свойства, анализ, применение. Пер. с англ. Н. Зорина / Под науч. ред. Л.П. Зайченко. — Санкт-Петербург: Профессия, 2007. — 239 с.
4. Меньшикова С.В., Кетова Г.Г., Попилов М.А. Малоизвестные свойства полисорба // Главный врач юга России (Токсикология). — 2018. — № 1(59). — С. 32–34.
5. Пирогов А.В., Шпигун О.А. Применение микроэмульсий в жидкостной хроматографии и электрокинетических методах анализа. Достоинства и недостатки подхода // Журнал аналитической химии. — 2000. — Т. 75. — № 2. — С. 99–108.
6. Попилов А.Н. Средство с мембраностабилизирующим эффектом. Патент РФ 2.253.459; опубл. 10.06.2005. — Бюл. № 16. — 4 с.
7. Пушкарь В.Г., Кулаков М.Я. Совершенствование метода приготовления иммуносорбентов с магнитными свойствами для хемилуминесцентного анализа // Проблемы особо опасных инфекций. — 2013. — № 4. — С. 112–114.
8. Шаройко В.В., Юрьев Г.О., Постнов В.Н., Мещеряков А.А., Агеев С. В., Иванова Д.А., Петров А.В., Лутцев М.Д., Нащекин А.В., Ямалова Н.Р. Васина Л.В., Соловцова И.Л., Мурин И.В., Семенов К.Н. Биосовместимость наноконструкта на основе аэросила 380 и карбоксилированного фуллерена $C_{60}[C(COOH)_2]_3$ // Журнал биотехнологии. — 2021. — С. 83–98.
9. Шкляева А.С., Васильева О.В., Кучук В.И. Исследование физико-химических свойств водной дисперсии энтеросорбента полисорба МП // Бутлеровские сообщения. — 2013. — Т. 35. — № 8. — С. 94–99.
10. Штыков С.Н. Поверхностно-активные вещества в анализе. Основные достижения и тенденции развития // Журнал аналитической химии. — 2000. — Т. 55. — № 7. — С. 679–686.
11. Tuvshinzaya Z., Yoshikazu F., Manyando S., Akihiro O., Mai T., Misheck S., Tomoko S., Norikazu I., Jargalsaikhan E., Hideaki H. Development of ELISA based on *Bacillus anthracis* capsule biosynthesis protein CapA for naturally acquired antibodies against anthrax // Plos One. — 2021. — Vol. 16. — No. 10. — Art. e0258317. doi: 10.1371/journal.pone.0258317.

References

1. Ayler R. Khimiya kremnezema: rastvorimost', polimerizatsiya, kolloidnyye i poverkhnostnyye svoystva, biokhimiya v 2 chastyakh. Per s angl LT Zhuravleva. Pod red VP Pryanishnikova. Moscow: Mir, 1982: 416 (in Russian).
2. Dyuga G, Penni K. Bioorganicheskaya khimiya. Moscow: Mir, 1983: 348–352 (in Russian).
3. Lange KR. Poverkhnostno-aktivnyye veshchestva: sintez, svoystva, analiz, primeneniye. Per s angl N Zorina. Pod nauch red LP Zaychenko. Sankt-Peterburg: Professiya, 2007: 239 (in Russian).
4. Men'shikova SV, Ketova GG, Popilov MA. Maloizvestnyye svoystva polisorbta. Glavnyy vrach yuga Rossii (Toksikologiya) 2018; 1(59):32–34 (in Russian).
5. Pirogov AV, Shpigun OA. Primeneniye mikroemul'siy v zhidkostnoy khromatografii i elektrokineticheskikh metodakh analiza. Dostoinstva i nedostatki podkhoda. Zhurnal analiticheskoy khimii 2000; 75(2):99–108 (in Russian).
6. Popilov AN. Sredstvo s membranostabiliruyushchim effektom. Patent RF 2.253.459; opubl. 10.06.2005. Byul. 16: 4 (in Russian).
7. Pushkar' VG, Kulakov MYA. Sovershenstvovaniye metoda prigotovleniya immunosorbentov s magnitnymi svoystvami dlya khemilyuminestentnogo analiza. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2013; 4:112–114 (in Russian).
8. Sharoyko VV, Yur'yev GO, Postnov VN, Meshcheryakov AA, Ageyev S V, Ivanova DA, Petrov AV, Lutsev MD, Nashchekin AV, Yamalova NR Vasina LV, Solovtsova IL, Murin IV, Semenov KN. Biosovmestimost' nanokompozita na osnove aerosila 380 i karboksilirovannogo fullerena $C_{60}[C(COOH)_2]_3$. Zhurnal biotekhnologii 2021: 83–98 (in Russian).
9. Shklyayeva AS, Vasil'yeva OV, Kuchuk VI. Issledovaniye fiziko-khimicheskikh svoystv vodnoy dispersii enterosorbenta polisorbta MP. Butlerovskiyee soobshcheniya 2013; 35(8):94–99 (in Russian).
10. Shtykov SN. Poverkhnostno-aktivnyye veshchestva v analize. Osnovnyye dostizheniya i tendentsii razvitiya. Zhurnal analiticheskoy khimii 2000; 55(7):679–686 (in Russian).
11. Tuvshinzaya Z, Yoshikazu F, Manyando S, Akihiro O, Mai T, Misheck S, Tomoko S, Norikazu I, Jargalsaikhan E, Hideaki H. Development of ELISA based on *Bacillus anthracis* capsule biosynthesis protein CapA for naturally acquired antibodies against anthrax. Plos One 2021; 16(10):e0258317. doi: 10.1371/journal.pone.0258317.

DEVELOPMENT AND COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF TULAREMIA SILICA MAGNOIMMUNOSORBENTS FOR IMMUNOENZYME ANALYSIS

A.S. GEOGDJAYAN, I.V. ZHARNIKOVA, A.A. SEMIRCHEVA, D.V. RUSANOVA

Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol

Currently, the problem of development of magnetically susceptible sorbents with selective properties for concentration of pathogens of especially dangerous infections with subsequent indication in serological analyses. The aim of the study – development and comparative characteristics of tularemia silica magnoimmunosorbents in the formulation of enzyme immunoassay. Physicochemical, bacteriological, serological, and statistical research methods were used in the work. Silica magnosorbents were obtained on the basis of iron (II) oxide, aerosil, polysorb MP, with/without activation of the matrices with rheopolyglucine and surfactant. During the research, 7 variants of magnetic immunosorbents with different sensitivity in ELISA were developed and analyzed: in the calcination version – 1×10^5 m.k./ml; with a long gelation period (12–18 hours) and grinding of sorbents – 1×10^5 – 1×10^4 m.k./ml; without calcination, grinding – 1×10^4 – 1×10^3 m.k./ml. Variants with polysorb MP and with aerosil showed sensitivity in ELISA: 1×10^4 – 1×10^3 m.k./ml. They conclude that an effectiveness of using aerosil, polysorb MP for the construction of silica magnoimmunosorbents with subsequent formulation of ELISA is almost similar. When developing drugs, it is necessary to exclude the process of calcination of magnosorbents, since the sensitivity of ELISA decreases. The use of surfactant sodium lauryl sulfate had a positive effect on the performance of magnoimmunosorbents when using this technology, which was reflected in the higher sensitivity of ELISA.

Keywords: silica magnesorbents, magnoimmunosorbents, enzyme immunoassay, *Francisella tularensis*, iron oxide, aerosil, polysorb.

Address:

Geogdjan A.S.
Researcher, research and production laboratory of drugs
for the diagnostics of particularly dangerous and other infections,
Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor,
E-mail: annageogdjan@yandex.ru

Для цитирования:

Геогджаян А.С., Жарникова И.В., Семирчева А.А., Русанова Д.В., Дубянский В.М. Разработка и сравнительная характеристика кремнезёмных магноиммуносорбентов туляремийных для иммуноферментного анализа. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2024; 20(1):35–40.

For citation:

Geogdjan A.S., Zharnikova I.V., Semircheva A.A., Rusanova D.V. Development and comparative characterization of tularemia silica magnoimmunosorbents for immunoenzyme analysis. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(1):35–40 (in Russian).

АССОЦИАЦИЯ ГЕНОВ LEP И TG5 С МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТЬЮ КОРОВ ПЕРВОТЕЛОК ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОДЫ

К.Ю. НИКОЛАЕВА^{1*}, Ф.Ф. ЗИННАТОВ¹, Т.М. АХМЕТОВ^{1,2},
Ф.Ф. ЗИННАТОВА³, Р.Р. ХИСАМОВ¹

¹ Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана,

² Академия наук Республики Татарстан,

³ Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства — обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНИЦ РАН, Казань

Молочное скотоводство является важной отраслью животноводства, и поэтому постоянное развитие этой области необходимо для обеспечения населения молочными продуктами. Цель работы состояла в выявлении связи молочной продуктивности с полиморфизмом генов LEP и TG5. Объектом исследования служили 100 голов коров-первотелок голштинской породы Сельскохозяйственного производственного кооператива племенного завода имени Ленина Атнинского района Республики Татарстан. Для выделения ДНК из хвостовой вены были отобраны пробы крови. Для определения полиморфизма генов лептина и тиреоглобулина был использован метод ПЦР-ПДРФ анализа. Результаты этого исследования позволили оценить генетический потенциал голштинской породы и отдельных животных в отношении молочной продуктивности. По результатам исследований было установлено, что наибольшим количеством молока за удой и содержанием жира в нем обладают коровы с комплексным генотипом LEP^{TT}TG5^{TT}. С помощью этих данных возможно корректировать и контролировать селекционные процессы в молочном скотоводстве. Необходимо использовать идентифицированных первотелок-носителей желательных аллелей при формировании родительских пар для воспроизводства новых коров с лучшей молочной продуктивностью и жирностью молока.

Ключевые слова: голштинская порода, крупный рогатый скот, ДНК, метод ПЦР, LEP, TG5, генотип, аллель, молочная продуктивность, жирность молока.

Введение

Молочное животноводство играет значительную роль в аграрном комплексе нашей страны. В последние десятилетия мы вкладываем огромное количество усилий в улучшение сельского хозяйства. Особое внимание уделяется молочному животноводству, так как молочные продукты находятся в широкой доступности для населения. По этой причине молоко и его продукция составляют значимую долю в объеме продукции, производимой в отрасли сельского хозяйства. В формировании молочного стада чаще используются животные голштинской породы, общее количество которых в настоящее время составляет более четверти общего числа молочного скота в России.

При работе с голштинскими коровами необходимо уделить особое внимание первотелкам. Изучение их генетического потенциала имеет практическую ценность, так как позволяет выделить лучших кандидатов для использования в качестве родительских пар. Этот процесс имеет большое значение для производства высокопродуктивного потомства и, соответственно, в улучшении сельскохозяйственной продукции. Маркерная селекция — эффективный метод, который позволяет определить желаемые генетические характеристики у животных.

Использование генетических маркеров с целью оценки у крупного рогатого скота молочной продуктивности позволяет более точно определить генетический потенциал коров голштинской породы и отдельных животных, а также эффективно корректировать и контролировать селекционные процессы. Исследование генома сельскохозяйственных животных на наличие генов, связанных с молочной продуктивностью, таких как гены лептина (LEP) и тиреоглобулина (TG5), поможет решить множество селекционных задач.

© 2024 г. Николаева К.Ю., Зиннатов Ф.Ф., Ахметов Т.М., Зиннатова Ф.Ф., Хисамов Р.Р.

* Автор для переписки:

Николаева Карина Юрьевна
аспирант, Казанская государственная академия ветеринарной
медицины имени Н. Э. Баумана
E-mail: kn261200@gmail.com

Основной целью данного исследования является проведение молекулярно-генетического анализа с применением генетических маркеров для оценки генетического потенциала коров, а также изучение взаимосвязи между определенными генами и показателями молочной продуктивности с использованием ДНК-диагностики. Это даст возможность более точно определить генетический потенциал не только породы в целом, но и отдельных животных, а также обеспечить эффективный контроль и корректировку селекционных процессов.

Материалы и методы

В марте 2023 года проводились исследования, в ходе которых были получены образцы ДНК из клеток крови 100 первотелок голштинской породы, которые были предоставлены Сельскохозяйственным производственным кооперативом племенному заводу имени Ленина Атнинского района Республики Татарстан. Кровь для анализа была собрана с помощью вакуумных пробирок из хвостовой вены. Для выделения ДНК использовался комплект реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» для экстракции ДНК из крови, а также специальное оборудование, такие как термостат Гном, миницентрифуга

MiniSpin, вортекс Vortex V-1, а также микропробирки, автоматические дозаторы и наконечники различных объемов. Амплификация фрагментов ДНК проводилась в амплификаторе T100 Thermal Cycler. Состав ПЦР-смеси был следующим: вода дистиллированная, Taq-полимераза, анализируемый образец ДНК и буферный раствор. Для амплификации фрагментов генов LEP и TG5 использовались соответствующие праймеры:

- LEP-F1: 5'-GAC-GAT-GTG-CCA-CGT-GTG-GTT-TCT-TCT-GT-3',
- LEP-R1: 5'-CGG-TTC-TAC-CTC-GTC-TCC-CAG-TCC-CTC-C-3',
- LEP-F2: 5'-TGT-CTT-ACG-TGG-AGG-CTG-TGC-CCA-GCT-3',
- LEP-R2: 5'-AGG-GTT-TTG-GTG-TCA-TCC-TGG-ACC-TTT-CG-3',
- TG5-F: 5'-GGG-GAT-GAC-TAC-GAG-TAT-GAC-TG-3',
- TG5-R: 5'-GTG-AAA-ATC-TTG-TGG-AGG-CTG-TA-3'.

ПЦР проводили с 2 мкл ДНК-образца, общий объем реакционной смеси в одной пробирке составлял 20 мкл. Точные данные для проведения амплификации приведены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Состав смеси для проведения тетрапраймерной амплификации фрагментов гена LEP

| Реагенты | Исходная концентрация | Рабочая концентрация | На 1 пробу (мкл) |
|--------------------|-----------------------|----------------------|------------------|
| dH ₂ O | | | 12,6 |
| dNTPs | 2,5 мМ | 0,25 мМ | 2 |
| Буфер | ×10 | ×1 | 2 |
| Taq ДНК полимераза | 5 ед | 1 ед | 0,2 |
| LEP-F1 | 50 мкМ | 0,5 мкМ | 0,2 |
| LEP-R1 | 50 мкМ | 0,5 мкМ | 0,2 |
| LEP-F2 | 50 мкМ | 1 мкМ | 0,4 |
| LEP-R2 | 50 мкМ | 1 мкМ | 0,4 |
| ДНК | | | 2 |
| Итого | | | 20 |

Таблица 2

Состав реакционной смеси для амплификации гена TG5

| Реагенты | Исходная концентрация | Рабочая концентрация | На 1 пробу (мкл) |
|--------------------|-----------------------|----------------------|------------------|
| dH ₂ O | | | 12,4 |
| dNTPs | 2,5 мМ | 0,25 мМ | 2 |
| Taq Буфер | ×10 | ×1 | 2 |
| Taq ДНК полимераза | 5 ед | 1 ед | 0,2 |
| TG5 F | 11,5 мкМ | 0,5 мкМ | 0,87 |
| TG5 R | 190 мкМ | 0,5 мкМ | 0,53 |
| ДНК | | | 2 |
| Итого | | | 20 |

После амплификации гена тиреоглобулина был проведен рестрикционный гидролиз. Приготовленную смесь

помещали в термостат на 12 часов при 37 °С. С помощью метода горизонтального электрофореза в 2,5%-ном

агарозном геле была определена молекулярная масса продуктов ПЦР-ПДРФ анализа. Гель был приготовлен из агарозы, трисборатного буфера (ТВЕ-буфер) и 10%-ного бромистого этидия (5 мкл). Результаты были зафиксированы с помощью видеодокументирующей системы GelDoc.

Результаты

Была осуществлена серия исследований проб молока от 100 первотелок голштинской породы с использованием анализатора молока «Клевер» и программного пакета «Селекс» для анализа продуктивности. Результаты исследования показали, что средний удой молока коров за 305 дней лактации составляет 6345,2 кг, а за всю лактацию — 8348,1 кг. Среднее содержание жира в молоке составляет 4,26%.

В дальнейшем были проведены анализ ДНК клеток крови первотелок с помощью метода тетрапраймерной ПЦР и горизонтального электрофореза для окончательного анализа продуктов амплификации. Были обнаружены специфические фрагменты гена лептина протяженностью в 239 пар нуклеотидов, а также выявлены два аллеля — С и Т и генотипы — LEP^{TT}, LEP^{CT} и LEP^{CC}. Генотипу TT соответствует 239/131 п.н., CT — 239/164/131 п.н., а генотипу CC — 239/164 п.н.

Среди 100 коров 29 имели генотип TT, 48 — гетерозиготный генотип CT, а 23 — CC. Встречаемость гомозиготного генотипа TT составила 29%, CT — 48%, а CC — 23%, аллель Т — 0,53, аллель С — 0,47. Первотелки с генотипом LEP^{CC} являются представителями наивысшего удоя, который в среднем составил 6562,2 кг молока, у животных с LEP^{TT} удой оказался ниже — 6391,1 кг, а у коров с LEP^{CT} самый низкий удой в сравнении с коровами других генотипов — 6213,6 кг.

По содержанию жира в молоке лидировали первотелки с генотипом LEP^{TT} — 4,45%; у коров с генотипом LEP^{CT} он немного ниже — 4,24%; а у животных с

LEP^{CC} содержание жира оказалось наименьшим — 4,09%.

В ходе амплификации ДНК лейкоцитов крови первотелок с использованием праймеров TG5-F: 5'-GGG-GAT-GAC-TAC-GAG-TAT-GAC-TG-3' и TG5-R: 5'-GTG-AAA-ATC-TTG-TGG-AGG-CTG-TA-3' удалось получить фрагменты гена TG5 протяженностью в 548 нуклеотидов. С помощью проведения последующих рестрикционного гидролиза и электрофореза фрагментов в агарозном геле у коров были обнаружены два аллеля — С и Т, а также три генотипа TG5^{TT}, TG5^{CT}, TG5^{CC}. Фрагменты, состоящие из 473/75 нуклеотидов, соответствовали генотипу TT, фрагменты длиной 473/295/178/75 нуклеотидов — CT, а фрагменты длиной 295/178/75 нуклеотидов — генотипу CC.

Из 100 исследованных первотелок 8 оказались носителями генотипа TT, 35 — генотипа CT, а 57 — генотипа CC. Частота генотипа TT составила 8%, генотипа CT — 35%, а генотипа CC — 57%. Аллель Т составил 0,32, аллель С — 0,68. В исследовании установлено, что первотелки с TG5^{TT} демонстрировали наивысшую удоинность — 7135,6 кг молока, в то время как коровы с TG5^{CT} немного отставали по удою — 6360,7 кг, а у скота с генотипом TG5^{CC} удой составил 6224,8 кг.

Наиболее жирным оказалось молоко коров с TG5^{TT} — 4,39%, далее следуют первотелки группы TG5^{CC} с 4,34% жира, а коровы с генотипом TG5^{CT} демонстрировали содержание жира на уровне 4,12%.

В рамках проведенных исследований также были изучены частоты встречаемости различных сочетаний генотипов генов TG5 и LEP, в результате чего было выявлено 9 различных комплексных генотипов среди 100 исследованных первотелок: LEP^{CC}TG5^{CC}, LEP^{CC}TG5^{CT}, LEP^{CC}TG5^{TT}, LEP^{CT}TG5^{CC}, LEP^{CT}TG5^{CT}, LEP^{CT}TG5^{TT}, LEP^{TT}TG5^{CC}, LEP^{TT}TG5^{CT}, LEP^{TT}TG5^{TT} (табл. 3).

Таблица 3

Комплексные генотипы генов лептина и тиреоглобулина и их взаимосвязь с молочной продуктивностью первотелок

| Комплексные генотипы | Количество | | Показатели продуктивности молока | | |
|-------------------------------------|------------|----|----------------------------------|-----------|------------------------|
| | голов | % | Удой, кг | Жир, % | Массовая доля жира, кг |
| LEP ^{CC} TG5 ^{CC} | 10 | 10 | 6553,1±669,5 | 3,96±0,8 | 259,5±5,4 |
| LEP ^{CC} TG5 ^{CT} | 12 | 12 | 6527,25±256,5 | 4,34±0,2 | 283,3±0,5 |
| LEP ^{CC} TG5 ^{TT} | 1 | 1 | 7072 | 2,4 | 169,7 |
| LEP ^{CT} TG5 ^{CC} | 31 | 31 | 6037,32±242,8 | 4,43±0,03 | 267,45±0,07 |

| | | | | | |
|-------------------------------------|----|----|---------------|-----------|-------------|
| LEP ^{CT} TG5 ^{CT} | 14 | 14 | 6407,86±123,7 | 3,81±0,15 | 245,53±0,19 |
| LEP ^{CT} TG5 ^{TT} | 5 | 5 | 7128,33±655,6 | 4,31±0,1 | 307,23±0,66 |
| LEP ^{TT} TG5 ^{CC} | 16 | 16 | 6382,94±87,1 | 4,40±0,3 | 280,85±0,26 |
| LEP ^{TT} TG5 ^{CT} | 9 | 9 | 6065,11±348,5 | 4,31±0,2 | 260,78±0,7 |
| LEP ^{TT} TG5 ^{TT} | 2 | 2 | 7157±586,2 | 4,95±0,52 | 354,27±3,05 |

Корова с генотипом LEP^{TT}TG5^{TT} обладает наивысшим удоем — 7157 кг, демонстрирует высокие результаты по содержанию жира, в частности, процентное содержание жира составляет 4,95%, а массовая доля жира — в среднем 354,27 кг. Всего 2% из числа исследованных коров обладают этим генотипом. Корова с генотипом LEP^{CT}TG5^{CC} имеет высокий уровень удою — 7128,33 кг и показатели содержания жира выше среднего. Большинство коров обладает генотипом LEP^{CT}TG5^{CC}, который характеризуется средними показателями по всем показателям, за исключением высокого процентного содержания жира и его массовой доли — 4,43% и 267,45 кг соответственно.

Заключение

В ходе изучения качественных и количественных показателей молочной продуктивности, а также жирно-молочности первотелок голштинской породы, принадлежащих Сельскохозяйственному производственному кооперативу племенному заводу имени Ленина Агинского района РТ, были сделаны выводы, что средний удою коров за 305 дней лактации составляет 6345,2 кг молока, а средняя жирность молока — 4,26 %. В результате исследования проб крови коров методом ПЦР-ПДРФ анализа обнаружены три генотипа по генам лептина и тиреоглобулина. В ходе исследования генов LEP и TG5 нашли 9 комплексных генотипов, коровы с сочетанием генотипов LEP^{TT}TG5^{TT} являются лидерами по удою (7157 кг), жирности (4,95%) и выходу жира (354,27 кг).

Считают, что в связи с полигенным характером формирования признаков молочной продуктивности необходимо использовать вновь идентифицированных животных-носителей желательных аллелей при выборе родительских пар для производства потомства с лучшей молочной продуктивностью и жирностью. Также необходимо привлечение высококвалифицированных специалистов в области ветеринарной биотехнологии для создания и поддержания базы данных по генетическому материалу скота в целях автоматизации процесса управления генетической селекцией животных. В целом,

результаты работы согласуются с данными литературы (1–6, 8–11, 13–17).

Вклад авторов:

Все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Ахметзянова Ф.К., Кашаева А.Р., Смоленцев С.Ю. Эффективность концентратов «Проветекс» в кормлении лактирующих коров // Вестник Марийского государственного университета. Серия «Сельскохозяйственные науки. Экономические науки». — 2022. — Т. 8. — № 2. — С. 129–136.
2. Ежкова А.М., Файзрахманов Р.Н., Шакиров Ш.К., Файзрахманов Р.Н. Повышение эффективности молочного скотоводства и улучшение качества молока при использовании природных минералов // Вестник Казанского технологического университета. — 2014. — Т. 17. — № 10. — С. 149–152.
3. Зиннатова Ф.Ф., Алимов А.М., Зиннатов Ф.Ф. Взаимосвязь полиморфизма гена бета-лактоглобулина с молочной продуктивностью у коров и коров первотелок // Ученые записки КГАВМ. — 2012. — № 211. — С. 206–209.
4. Зорина В.В. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Методическое пособие. — Москва: ДНК-Технология, 2014. — 151 с.
5. Калашишникова Л.А., Хабибрахманова Я.А., Багаль И.Е., Ялуга В.Л., Прожерин В.П. Оценка полиморфизма комплексных генотипов CSN3, LGB, PRL, GH, LEP и молочной продуктивности у холмогорских коров // Молочное и мясное скотоводство. — 2019. — № 2. — С. 14–17.
6. Крупин Е.О., Шакиров Ш.К., Тагиров М.Ш. Молочная продуктивность и качество молока коров в зависимости от генотипа // Дальневосточный аграрный вестник. — 2017. — № 4. — С. 120–125.
7. Николаева К.Ю., Хасанова Л.Н. Взаимосвязь молочной продуктивности коров с полиморфизмом гена LGB // Молодежные разработки и инновации в решении приори-

- тетных задач АПК: Сборник материалов международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи, посвященной 150-летию ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, Казань, 15–16 марта 2023 года. Том I. — Казань: Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, 2023. — С. 124–127.
8. Беган М.А. и др. Полиморфизм генов лептина (LEP), тиреоглобулина (TG) и бета-казеина (CSN2) у голштинских коров / Сборник научных трудов Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства. — 2014. — Т. 3. — № 7. — С. 124–129.
 9. Рахматов Л.А. Оценка и отбор свиноматок по молочной продуктивности при селекции на интенсивность роста. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. — КГАВМ, 2011. — 18 с.
 10. Уливанова Г.В., Карелина О.А., Федосова О.А., Быстрова И.Ю., Незаленова А.А. Комплексное изучение молочной продуктивности коров голштинской породы и физико-химических свойств молока в условиях импортозамещения // Вестник Рязанского государственного агротехнологического университета имени П.А. Костычева. — 2022. — Т. 14. — №2. — С. 117–124.
 11. Хайруллин Д.Д., Шакиров Ш.К., Кашаева А.Р. Влияние углеводно-витаминно-минерального концентрата на морфологический состав крови дойных коров // Вестник АПК Ставрополя. — 2019. — № 4(36). — С. 36–39.
 12. Хасанова Л.Н., Николаева К.Ю. Идентификация полиморфизма гена каппа-казеина, маркера белкового обмена у коров голштинской породы // Молодежные разработки и инновации в решении приоритетных задач АПК: Сборник материалов международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи, посвященной 150-летию ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, Казань, 15–16 марта 2023 года. Том I. — Казань: Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, 2023. — С. 203–206.
 13. Хромова Л.Г., Мирошина С.Е., Мирошин С.Е., Морозова Н.И. Комплексная оценка молока коров голштинской породы различного экогенеза, производимого в условиях интенсивной технологии // Вестник Рязанского государственного агротехнологического университета имени П.А. Костычева. — 2022. — Т. 14. — № 1. — С. 76–83.
 14. Шарипова Д.М., Файзрахманов Р.Н., Ежков В.О. Комплексная кормовая добавка на органоминеральной основе и пробиотике для повышения продуктивности животных / «Технологические тренды устойчивого функционирования и развития АПК». Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной году науки и технологии в России. — Ижевск. — 2021. — С. 74–77.
 15. Шевхужев А.Ф., Криворучко А.Ю., Скорых Л.Н., Сафонова Н.С. Генетические маркеры качества мяса у крупного рогатого скота (обзорная статья) // Вестник РГАТУ. — 2022. — Т. 14. — № 4. — С. 97–105.
 16. Zinnatov F.F., Zinnatova F.F., Volkov A.H. et al. Studying the association of polymorphic variants of LEP, TG5, CSN3, LGB genes with signs of dairy productivity of cattle // International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences. — 2020. — Vol. 11. — No. 2. — P. 1428–1432.
 17. Zinnatov F.F., Zinnatova F.F., Akhmetov T.M., R.A. Volkov R.A. et al. Identification of relationship of polymorphic variants of lactoferrin gene (LTF) in cows with milk production indicators depending on their lineage // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. — 2020. — P. 548.

References

1. Akhmetzyanova FK, Kashayeva AR, Smolentsev SYu. Effektivnost' kontsentratorov «Proveteks» v kormlenii lak-tiruyushchikh korov. Vestnik Mariyskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya «Sel'skokhozyaystvennyye nauki. Ekonomicheskiye nauki» 2022; 8(2):129–136 (in Russian).
2. Yezhkova AM, Fayzrakhmanov RN, Shakirov SHK, Fayzrakhmanov RN. Povysheniye effektivnosti molochno-go skotovodstva i uluchsheniye kachestva moloka pri ispol'zovanii prirodnykh mineralov. Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta 2014; 17(10):149–152 (in Russian).
3. Zinnatova FF, Alimov AM, Zinnatov FF. Vzaimosvyaz' polimorfizma gena beta-laktoglobulina s molochnoy produktivnost'yu u korov i korov pervotelok. Uchenyye zapiski KGAVM 2012; 211:206–209 (in Russian).
4. Zorina VV. Osnovy polimeraznoy tsepnoy reaktsii (PTSR). Metodicheskoye posobiye. Moskva: DNK-Tekhnologiya, 2014: 151 (in Russian).
5. Kalashnikova LA, Khabibrakhmanova YAA, Bagal' IYe, Yaluga VL, Prozherin VP. Otsenka polimorfizma kompleksnykh genotipov CSN3, LGB, PRL, GH, LEP i molochnoy produktivnosti u kholmogorskikh korov. Molochnoye i myasnoye skotovodstvo 2019; 2:14–17 (in Russian).
6. Krupin YeO, Shakirov ShK, Tagirov MSh. Molochnaya produktivnost' i kachestvo moloka korov v zavisimosti ot genotipa. Dal'nevostochnyy agrarnyy vestnik 2017; 4:120–125 (in Russian).
7. Nikolayeva KYu, Khasanova LN. Vzaimosvyaz' molochnoy produktivnosti korov s polimorfizmom gena LGB. Molodezhnyye razrabotki i innovatsii v reshenii prioritetnykh zadach APK: Sbornik materialov mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii studentov, aspirantov i uchashcheyasya molodezhi, posvyashchennoy 150-letiyu FGBOU VO Kazanskaya GAVM, Kazan', 15–16 marta 2023 goda. Tom I. Kazan': Kazanskaya gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy meditsiny imeni NE Baumana, 2023: 124–127 (in Russian).
8. Began MA i dr. Polimorfizm genov leptina (LEP), tireoglobulina (TG) i beta-kazeina (CSN2) u golshtinskikh

- korov. Sbornik nauchnykh trudov Stavropol'skogo nauchno-issledovatel'skogo instituta zhitovnovodstva i kormoproizvodstva 2014; 3(7):124–129 (in Russian).
9. Rakhmatov LA. Otsenka i otbor svinomatok po molochnoy produktivnosti pri selektsii na intensivnost' rosta. Avtoreferat dissertatsii na soiskaniye uchenoy stepeni kandidata biologicheskikh nauk. KGAVM, 2011: 18 (in Russian).
 10. Ulivanova GV, Karelina OA, Fedosova OA, Bystrova IYu, Nezalenova AA. Kompleksnoye izucheniye molochnoy produktivnosti korov golshinskoy porody i fiziko-khimicheskikh svoystv moloka v usloviyakh importozameshcheniya. Vestnik Ryazanskogo gosudarstvennogo agrotekhnologicheskogo universiteta imeni PA Kostycheva 2022; 14(2):117–124 (in Russian).
 11. Khayrullin DD, Shakirov SHK, Kashayeva AR. Vliyaniye uglevodno-vitaminno-mineral'nogo kontsentrata na morfologicheskii sostav krovi doynnykh korov. Vestnik APK Stavropol'ya 2019; 4(36):36–39 (in Russian).
 12. Khasanova LN, Nikolayeva KYu. Identifikatsiya polimorfizma gena kappa-kazeina, markera belkovogo obmena u korov golshinskoy porody. Molodezhnyye razrabotki i innovatsii v reshenii prioritnykh zadach APK: Sbornik materialov mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii studentov, aspirantov i uchashcheyasya molodezhi, posvyashchennoy 150-letiyu FGBOU VO Kazanskaya GAVM, Kazan', 15–16 marta 2023 goda. Tom I. Kazan': Kazanskaya gosudarstvennaya akademiya veterinarnoy meditsiny imeni N.E. Bauman, 2023: 203–206 (in Russian).
 13. Khromova LG, Miroshina SYe, Miroshin SYe, Morozova NI. Kompleksnaya otsenka moloka korov golshinskoy porody razlichnogo ekogeneza, proizvodimogo v usloviyakh intensivnoy tekhnologii. Vestnik Ryazanskogo gosudarstvennogo agrotekhnologicheskogo universiteta imeni PA Kostycheva 2022; 14(1):76–83 (in Russian).
 14. Sharipova DM, Fayzrakhmanov RN, Yezhkov VO. Kompleksnaya kormovaya dobavka na organomineral'noy osnove i probiotike dlya povysheniya produktivnosti zhitovnykh / «Tekhnologicheskiye trendy ustoychivogo funktsionirovaniya i razvitiya APK». Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy godu nauki i tekhnologii v Rossii. Izhevsk 2021;74–77 (in Russian).
 15. Shevkhezhev AF, Krivoruchko AYU, Skorykh LN, Safonova NS. Geneticheskiye markery kachestva myasa u krupnogo rogatogo skota (obzornaya stat'ya). Vestnik RGATU 2022; 14(4):97–105 (in Russian).
 16. Zinnatov FF, Zinnatova FF, Volkov AH et al.. Studying the association of polymorphic variants of LEP, TG5, CSN3, LGB genes with signs of dairy productivity of cattle. International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences 2020; 11(2):1428–1432.
 17. Zinnatov FF, Zinnatova FF, Akhmetov TM, RA Volkov RA et al.. Identification of relationship of polymorphic variants of lactoferrin gene (LTF) in cows with milk production indicators depending on their lineage. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 2020: 548.

ASSOCIATION OF LEP AND TG5 GENES WITH MILK PRODUCTIVITY OF HOLSTEIN FIRST-CALF COWS

K.Yu. NIKOLAEVA¹, F.F. ZINNATOV¹, T.M. AKHMETOV^{1,2},
F.F. ZINNATOVA³, R.R. KHISAMOV¹

¹ Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman,

² Academy of Sciences of the Republic of Tatarstan,

³ Tatar Scientific Research Institute of Agriculture, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
Kazan, Russia

Dairy cattle breeding is an essential aspect of animal husbandry, and continuous development in this field is necessary to meet the population's demand for dairy products. The objective of this study is to determine the association between milk productivity and the polymorphism of LEP and TG5 genes. The study focused on 100 first-calf heifers of the Holstein breed from the Agricultural Production Cooperative «Lenin» in the Atninsky district of the Republic of Tatarstan. Blood samples were collected from the tail vein to extract DNA. The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis method was employed to identify the polymorphism of leptin and thyroglobulin genes. The study results allowed for an assessment of the genetic potential of the Holstein breed and individual animals in terms of milk productivity. Analysis of the relationship between polymorphism in LEP and TG5 genes and milk productivity revealed that cows with the LEPTTTG5TT complex genotype exhibited the highest milk fat content and milk yield. These findings will be valuable for controlling and adjusting breeding processes in cattle breeding. It is crucial to utilize newly identified animals carrying desirable alleles when selecting parent pairs to produce offspring with improved milk productivity and milk fat content.

Keywords: Holstein breed, cattle, DNA, PCR method, LEP, TG5, genotype, allele, milk productivity, milk fat content.

Address:

Nikolaeva K.Yu.
postgraduate student, Kazan State Academy of Veterinary
Medicine named after N.E. Bauman
E-mail: kn261200@gmail.com

Для цитирования:

Николаева К.Ю., Зиннатов Ф.Ф., Ахметов Т.М., Зиннатова Ф.Ф., Хисамов Р.Р. Ассоциация генов LEP и TG5 с молочной продуктивностью коров первотелок голштинской породы. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2024; 20(1):41–47.

For citation:

Nikolaeva K.Yu., Zinnatov F.F., Akhmetov T.M., Zinnatova F.F., Khisamov R.R. Association of LEP and TG5 genes with milk productivity of Holstein first-calf cows. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(1):41–47 (in Russian).

ХАРАКТЕРИСТИКА И РОСТОСТИМУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА НОВОГО ШТАММА БАКТЕРИЙ РОДА *STENOTROPHOMONAS*

Л.Р. ХАКИМОВА^{1,3}, О.В. ЧУБУКОВА^{1,2}, Е.С. АКИМОВА¹, З.Р. ВЕРШИННИНА^{1,2*}

¹Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение ФГБНУ Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук,

²ФГБОУ ВО «Уфимский государственный нефтяной технический университет»,

³ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России

Бактерии рода *Stenotrophomonas* обладают широким кругом функциональных свойств, позволяющих использовать их для борьбы с вредителями и патогенами, а также для стимулирования роста различных растений. Определенные эффективные штаммы потенциально могут стать основой при создании биоудобрений. Целью данного исследования было описание ростостимулирующих свойств ризосферного штамма *Stenotrophomonas* sp. ОВА 2.13. В результате исследуемый штамм показал свои положительные plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) свойства, проявляющиеся в увеличении энергии прорастания семян и улучшении роста корней растений гороха (*Pisum sativum* L.) даже при кадмиевом стрессе. При этом бактериальный штамм показывал устойчивость к CdCl_2 в среде до 0,3 мМ, положительные фосфатмобилизующую и сидерофорную активности. Обработка штаммом *Stenotrophomonas* sp. ОВА 2.13 усиливала рост корней проростков семян гороха на 30,9%, а в присутствии 0,25 мМ CdCl_2 рост корней растений, обработанных бактериями замедлялся, но был лучше, чем у семян без обработки на 34,3%. Полученные данные показывают, что такие ростостимулирующие *Stenotrophomonas* sp. могут быть использованы с целью создания эффективных биопрепаратов для защиты сельскохозяйственных растений от воздействия тяжёлых металлов и для использования в рекультивации пахотных земель.

Ключевые слова: PGPR, *Stenotrophomonas* sp., ген 16S рРНК, фосфат-мобилизующая активность, сидерофоры, кадмий.

Введение

Бактерии *Stenotrophomonas* sp. широко распространены в различных экосистемах, однако виды из этого рода изучены не так подробно. Наиболее известен типовой вид *S. maltophilia*, который имеет медицинское значение, потому что является условным патогеном. Изначально данный вид был выделен из плевральной жидкости человека и получил название как «*Bacterium bookeri*», далее он был отнесен к роду «*Pseudomonas*» *maltophilia*, впоследствии — к виду «*Xanthomonas*» *maltophilia*, а позже был описан как единственный представитель отдельного нового рода *Stenotrophomonas* [18].

В последние годы бактерии рода *Stenotrophomonas* стали рассматриваться как потенциальные PGPR с полезными свойствами благодаря способности продуцировать сидерофоры, фосфатмобилизации, синтезировать фитогормоны и спермидин [13]. Был обнаружен ростостимулирующий эффект у бактерий этого рода на разные виды растений. Например, эндофитный штамм *Stenotrophomonas* 169, выделенный из надземных частей тополя, увеличивал массу корней и побегов инокулированных растений тополя *in vitro* и стимулировал укоренение черенков этого растения [19]. Именно благодаря способности синтезировать соединения, подобные индол-3-уксусной кислоте (ИУК) [20], эндофитный штамм ES2 *Stenotrophomonas* sp. способствует росту растений *in vitro*. *S. chelatiphaga* был описан как ризобактерии, продуцирующие сидерофоры и стимулирующие рост растений рапса (*Brassica napus* L.) и кукурузы (*Zea mays* L.) [9]. Были также обнаружены образующие сидерофоры штаммы *Stenotrophomonas* sp. в ризосфере растений томата (*Lycopersicon esculentum*) [10]. Три штамма рода *Stenotrophomonas*, выделенные из здоровых растений томата, были способны продуцировать индол-

© 2024 г. Хакимова Л.Р., Чубукова О.В., Акимова Е.С., Вершинина З.Р.

* Автор для переписки:

Вершинина Зилия Рифовна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник Института биохимии и генетики УФИЦ РАН, доцент кафедры Школа молекулярных технологий ФГБОУ ВО «Уфимский государственный нефтяной технический университет» (УГНТУ)

E-mail: zilyaver@mail.ru

3-уксусную кислоту, а два из них обладали способностью растворять фосфаты [7].

Идентификация *Stenotrophomonas* sp. осложнена тем, что виды генотипически очень близки и имеют сходство в последовательности генов 16S рРНК на 95,7–99,6%. Поэтому для разделения на виды рассматриваются и другие гены, например, *gyrB*, который кодирует β -субъединицу ДНК-гиразы. Большинство типовых штаммов показывает различия в последовательности гена *gyrB* более чем на 7% [18].

Итак, бактерии рода *Stenotrophomonas* представляют большой интерес с точки зрения их биобезопасности и эффективности в отношении роста и развития растений, то есть их можно отнести к PGPR, обнаруживающим хороший потенциал в качестве эффективных биоиноккулянтов для стимуляции роста растений и борьбы с широким спектром патогенов растений [4, 17].

Целью настоящего исследования были описание биологической активности штамма *Stenotrophomonas* sp. ОВА 2.13 и анализ его ростостимулирующих свойств на растениях гороха (*Pisum sativum* L.), в том числе при стрессовых условиях.

Материалы и методы

Бактериальный штамм *Stenotrophomonas* sp. ОВА 2.13 выделен из ризосферы остролодочника башкирского (*Oxytropis baschkiriensis*). Был идентифицирован с помощью секвенирования гена 16S рРНК и внесен в коллекцию клубеньковых и ризосферных бактерий «Симбионт» ИБГ УФИЦ РАН (Уфа). Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3500 («Applied Biosystems, Inc.», США) с использованием наборов «Big Dye Terminator v.3.1». Филогенетическое древо было построено с использованием метода множественного выравнивания Clustal W в программе Megalign Lasergene («DNASTAR», США), полученную последовательность сравнивали с нуклеотидными данными типовых штаммов *Stenotrophomonas* sp., взятыми из базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Статистическую достоверность ветвления (bootstrap-анализ) оценивали с использованием соответствующей функции программы Megalign на основе 1000 альтернативных деревьев [3].

Определение способности штамма *Stenotrophomonas* sp. ОВА 2.13 к мобилизации неорганического фосфора проверяли на чашках со средой Муромцева (глюкоза 10 г/л, аспарагин 1 г/л, K_2SO_4 0,2 г/л, $MgSO_4$

0,2 г/л, кукурузный экстракт 0,02 г/л, агар 20 г/л; рН 6,8), содержащей нерастворимый фосфат. В качестве источника фосфора в среду добавляли $Ca_3(PO_4)_2$ в концентрации 5 г/л [3]. Суточную культуру бактерий наносили в виде капли на поверхность агаризованной среды, инкубировали при температуре 28 °С. Для определения способности синтезировать сидерофоры была использована среда с CAS-реактивом (синий агар). Для приготовления 100 мл среды 6,5 г хромазуrolа S растворяли в 5 мл воды и смешивали с 1 мл раствора, содержащего 1 мМ $FeCl_3$ и 10 мМ HCl . После этого к раствору хромазуrolа добавляли 4 мл раствора, содержащего 7,3 мг НДТМА. Полученную смесь автоклавируют и добавляли в стерильную среду LB. На полученном «синем агаре» выращивали бактерии в течение 2–5 дней. Изменение окраски на желтую, оранжевую или розовую выявляло выделение сидерофоров [12].

Для анализа ростостимулирующих свойств бактерий использовали семена растений гороха сорта Памяти Попова (Чишминский селекционный центр БНИИСХ УФИЦ РАН). Стерилизацию семян проводили в течение 1 мин в 70% спирте, а после – 20 мин в 10%-ном растворе гипохлорита натрия. Далее семена обрабатывали суспензией бактерий в течение 30 мин и проращивали на фильтровальной бумаге в стерильной воде (контроль) и в присутствии $CdCl_2$ в концентрациях 0,25 мМ. Для инокуляции суспензию бактерий разбавляли до 10^7 КОЕ/мл стерильной жидкой средой LB. Семена проращивали при комнатной температуре. Все морфометрические измерения проводили через 7 дней культивирования семян растений с бактериями, энергию прорастания считали через 3 дня. Для определения ростостимулирующего эффекта штаммов у семян измеряли длину побега. Для анализа было использовано по 50 растений в каждом варианте опыта при трехкратной повторности.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием пакета Microsoft Office Excel 2010, доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости.

Результаты и обсуждение

Для определения родовой принадлежности выделенного штамма секвенировали нуклеотидную последовательность фрагмента консервативного гена 16S рРНК, который используется для идентификации бактерий. В результате сравнительного анализа полученной нуклеотидной последовательности было построено филогене-

тическое древо, в котором показано, что исследуемый штамм относится к роду *Stenotrophomonas*. На древе сходства генов 16S рРНК исследуемый штамм образует отдельную ветвь с типовым штаммом *S. rhizophila* JCM 13333Т, уровень гомологии составил 99,9% (рис. 1).

Следовательно, исследуемый штамм был внесен в коллекцию клубеньковых и ризосферных бактерий «Симбионт» под названием *Stenotrophomonas* sp. ОВА 2.13, а его последовательность гена 16S рРНК зарегистрирована в базе данных GenBank под номером ОК039227.

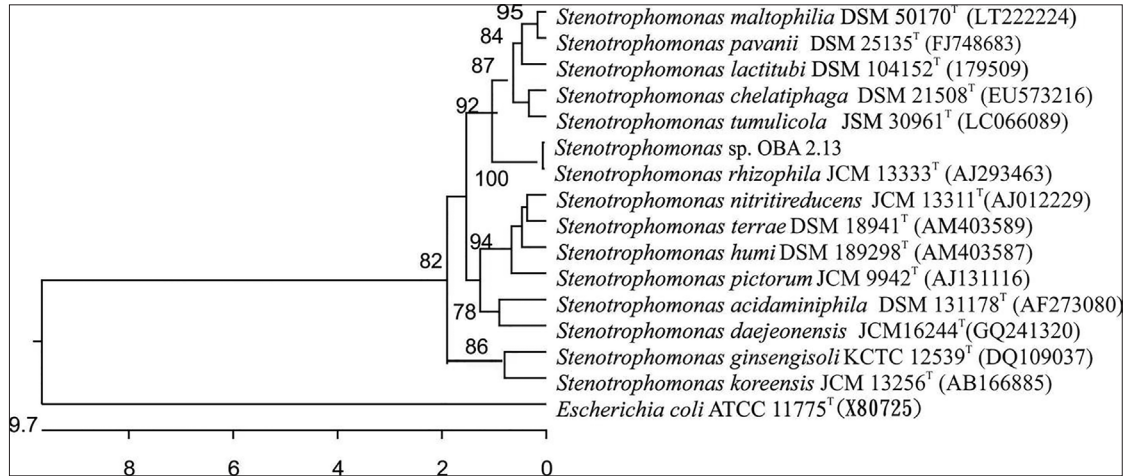


Рис. 1. Филогенетическое древо, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена 16S рРНК. Цифры показывают статистическую достоверность порядка ветвления, определенную с помощью «bootstrap»-анализа. В качестве внешней группы использована 16S рРНК *E. coli* ATCC 11775Т

Ростостимулирующие растения свойства PGPR достигаются за счет продукции целого ряда активных соединений, в том числе фитогормонов, сидерофоров, а также фосфатмобилизации и т.д. Мобилизация фосфатов помогает растениям усваивать фосфор. Фосфат часто является лимитирующим фактором роста растений, поскольку он присутствует в почве или в ризосфере в нерастворимой форме, которая не может быть использована растениями. Ризосферные бактерии могут солюбилизировать фосфор в доступную для растений форму, секретируя фосфатазы и фитазы, мобилизующие фосфаты из органических соединений; поэтому это свойство имеет большое значение для PGPR [2, 19]. Сидерофоры способны к поглощению железа из окружающей среды посредством хелатирования. На-

личие этого качества — продуцирования различных видов сидерофоров — широко распространено среди микроорганизмов, способствующих росту растений. Помимо положительного влияния на рост растений за счет увеличения доступности железа для растения, сидерофоры также могут ингибировать рост различных фитопатогенов за счет конкуренции за железо [1, 16]. С помощью качественных реакций было найдено образование прозрачной зоны вокруг колонии штамма *Stenotrophomonas* sp. ОВА 2.13 на среде Муромцева, что свидетельствовало о его способности растворять органический фосфор (рис. 2а). Кроме того, на синем агаре происходило изменение цвета среды, что указывает на способность штамма синтезировать сидерофоры (рис. 2б).

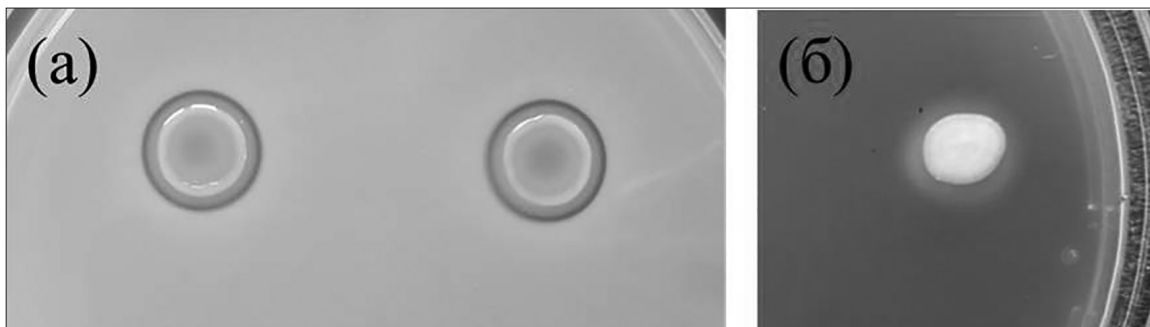


Рис. 2. Определение фосфат-мобилизующей (а) и сидерофорной (б) активности штамма *Stenotrophomonas* sp. ОВА 2.13. Примечание: фон агара в (б) синий

Для определения минимальной ингибирующей концентрации штамма *Stenotrophomonas* sp. ОВА 2.13 к CdCl_2 были построены кривые роста штамма в присутствии разных концентраций кадмия. При концентрации CdCl_2 в среде до 0,3 мМ бактериальный штамм демонстрировал устойчивость к кадмию, тогда как при концентрации 0,5

и больше рост штамма полностью подавлялся (рис. 3а). Также был рассмотрен рост исследуемого штамма в присутствии 0,25 мМ CdCl_2 в различные интервалы времени. Установлено, что присутствие тяжелого металла в среде сильно угнетало рост бактерий, хотя данный штамм показывал устойчивость до 0,3 мМ (рис. 3б).

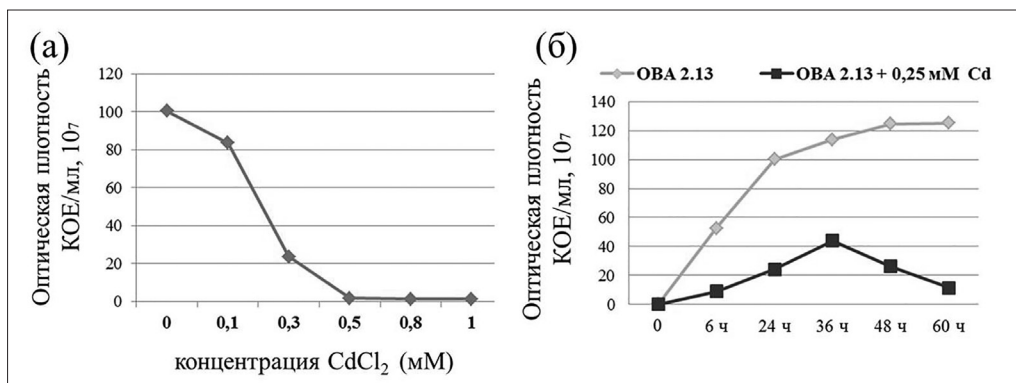


Рис. 3. Рост штамма *Stenotrophomonas* sp. ОВА 2.13 при разных концентрациях CdCl_2 через 24 часа роста на жидкой среде (а) и рост при 0,25 мМ CdCl_2 в течение 2,5 суток (б)

Высокую устойчивость к ТМ обнаруживают те бактериальные штаммы, которые изначально были выделены из источников с высоким загрязнением. Например, бактериальный штамм *S. maltophilia* SY-2, выделенный из загрязненных кадмием почв в горнодобывающем районе, показывал высокую устойчивость к кадмию до 1,0 мМ [14]. Выделенные четыре штамма *Stenotrophomonas* sp. имели хорошую устойчивость к кадмию, а также они были способны иммобилизовывать Cd^{2+} в почве [8].

Присутствие CdCl_2 отрицательно влияло на всхожесть и рост корней семян растений гороха. Всхожесть семян, обработанных штаммом ОВА 2.13, была выше, чем у семян, росших на воде или в присутствии 0,25

мМ CdCl_2 ($p > 0,05$). Обработанные водой проростки из семян гороха имели более короткую длину корней, чем семена, обработанные штаммом ОВА 2.13. Инокуляция бактериями усиливала рост корней проростков на 30,9% в отсутствие кадмия. При концентрации Cd 0,25 мМ рост корней растений, обработанных ОВА 2.13, замедлялся, но был лучше, чем у семян без обработки на 34,3% (рис. 4).

Полученные данные выявили, что инокуляция бактериями семян гороха оказывала положительное влияние на длину проростков, что может свидетельствовать о повышении устойчивости растения к кадмиевому стрессу на начальном этапе роста растений.

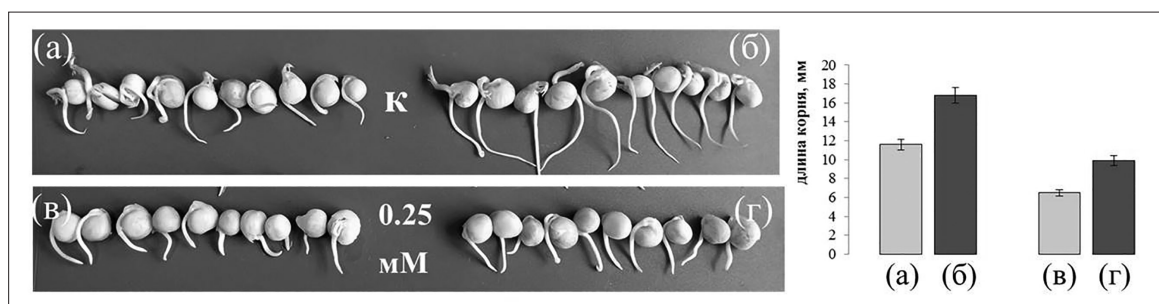


Рис. 4. Рост контрольных неинокулированных растений: гороха (а); семена, обработанные ОВА 2.13 (б); неинокулированные семена в присутствии 0,25 мМ CdCl_2 (в) и семена, обработанные ОВА 2.13 в присутствии 0,25 мМ CdCl_2 (г). На графиках показана длина корней обработанных и необработанных семян гороха

В литературных источниках описываются исследования, где обработанные ризосферным штаммом *S. maltophilia* SBP-9 семена растения пшеницы даже в условиях солевого стресса продемонстрировали увеличе-

ние длины побегов и корней, а также сбалансированное содержание хлорофилла по сравнению с контролем [17]. При обработке штаммом *S. maltophilia* ВJ01 улучшались урожай арахиса и содержание фотосинтетических пиг-

ментов и гормонов роста в условиях солевого стресса [5]. Штаммы *Stenotrophomonas* sp. были эффективны и при обработке растений сои и шпината в условиях солевого стресса [15]. Описывается и штамм *S. maltophilia* SR1, способный использовать некоторые ароматические углеводороды, включая бензол, толуол и ксилол, в качестве единственного источника углерода и при этом обнаруживший PGPR-свойства на растениях [6]. Равным образом ростостимулирующими качествами обладал устойчивый к мышьяку штамм *S. maltophilia* S255 [11].

Исследуемый штамм *Stenotrophomonas* sp. ОВА 2.13 показал свои положительные PGPR свойства, проявляющиеся в увеличении энергии прорастания семян и улучшении роста корней даже в присутствии кадмиевого стресса. Защитные свойства бактерий реализуются посредством разных механизмов. Возможным механизмом защиты растений от ТМ может быть механизм перекрестной реактивности между продукцией экзополисахаридов и сидерофоров у устойчивых к металлам *Stenotrophomonas* sp., равно как и улучшение питания растений за счет растворения фосфатов и т.д.

Таким образом, перспективными представляются исследования в области применения эффективных штаммов *Stenotrophomonas* sp. для защиты и улучшения роста сельскохозяйственных культур. Необходимо дальнейшее изучение возможностей бактерий данного рода в стимулировании роста растений в различных, в том числе и неблагоприятных для растений условиях среды. Кроме того, необходимо разработать молекулярно-генетические методы для идентификации и различия патогенных и непатогенных для человека штаммов с целью дальнейшего изучения последних и оценки возможности их применения в сельском хозяйстве.

Литература

1. Коршунова Т.Ю., Бакаева М.Д., Кузина Е.В., Рафикова Г.Ф., Четвериков С.П., Четверикова Д.В., Логинов О.Н. Роль бактерий рода *Pseudomonas* в устойчивом развитии агросистем и защите окружающей среды (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. — 2021. — Т. 57. — № 3. — С. 211–227.
2. Хакимова Л.Р., Чубукова О.В., Мурясова А.Р., Вершинина Э.Р. Влияние штамма *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 на растения гороха посевного (*Pisum sativum* L.) при ингибирующем действии солей кадмия // Биомика. — 2022. — Т. 14. — № 2. — С. 101–110.
3. Чубукова О.В., Хакимова Л.Р., Акимова Е.С., Вершинина Э.Р. Филогения и свойства новых штаммов *Pseudomonas* sp. из ризосферы бобовых растений Южного Урала // Микробиология. — 2022. — Т. 91. — № 5. — С. 537–546.
4. Alexander A., Singh V. K., Mishra A., Jha B. Plant growth promoting rhizobacterium *Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 augments endurance against N2 starvation by modulating physiology and biochemical activities of *Arachis hypogaea* // PLoS One. — 2019. — Vol. 14. — e0222405. doi: 10.1371/journal.pone.0222405.
5. Alexander A., Singh V. K., Mishra A. Halotolerant PGPR *Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 induces salt tolerance by modulating physiology and biochemical activities of *Arachis hypogaea* // Front. Microbiol. — 2020. — Vol. 11. — P. 568289. doi: 10.3389/fmicb.2020.568289.
6. Bashandy S.R., Abd-Alla M.H., Dawood M.F.A. Alleviation of the toxicity of oily wastewater to canola plants by the N2-fixing, aromatic hydrocarbon biodegrading bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* SR1 // Appl. Soil Ecol. — 2020. — Vol. 154. — P. 103654. doi: 10.1016/j.apsoil.2020.103654.
7. Ben Abdallah R.A., Jabnoun-Khiareddine H., Nefzi A., Daami-Remadi M. Evaluation of the growth-promoting potential of endophytic bacteria recovered from healthy tomato plants // J. Hortic. — 2018. — Vol. 5. — Art. 1000234. doi: 10.4172/2376-0354.1000234.
8. Fan R., Xie W., Ma H., Zhu M., Ma K., Yan X. Isolation of cadmium-resistant microbial strains and their immobilization of cadmium in soil // Biodegradation. — 2023. — Vol. 34(5). — P. 445–459.
9. Ghavami N., Alikhani H. A., Pourbabaei A.A., Besharati H. Effects of two new siderophore-producing rhizobacteria on growth and iron content of maize and canola plants // Journal of Plant Nutrition. — 2017. — Vol. 40(5). — P. 736–746.
10. Guerrieri M.C., Fanfoni E., Fiorini A., Trevisan M., Puglisi E. Isolation and screening of extracellular PGPR from the rhizosphere of tomato plants after long-term reduced tillage and cover crops // Plants. — 2020. — Vol. 9(5). — Art. 668. doi: 10.3390/plants9050668.
11. Huda N., Tanvir R., Badar J., Ali I., Rehman Y. Arsenic-resistant plant growth promoting *Pseudoxanthomonas mexicana* S254 and *Stenotrophomonas maltophilia* S255 isolated from agriculture soil contaminated by industrial effluent // Sustainability. — 2022. — Vol. 14. — P. 10697. doi: 10.3390/su141710697.
12. Khakimova L., Chubukova O., Vershinina Z., Maslennikova D. Effects of *Pseudomonas* sp. ОВА 2.4.1 on growth and tolerance to cadmium stress in *Pisum sativum* L. // BioTech. — 2023. — Vol. 12. — Art. 5. doi: 10.3390/biotech12010005.
13. Kumar A., Rithesh L., Kumar V., Raghuvanshi N., Pandey A.K. *Stenotrophomonas* in diversified cropping systems: friend or foe? // Front. Microbiol. — 2023. — Vol. 14. — Art. 1214680. doi: 10.3389/fmicb.2023.1214680.
14. Liaquat F., Munis M.F.H., Arif S. et al. Cd-tolerant SY-2 strain of *Stenotrophomonas maltophilia*: A potential PGPR,

- isolated from the Nanjing mining area in China // *Biotech.* – 2020. – Vol. 10. – No. 12. – Art. 519. doi: 10.1007/s13205-020-02524-7.
15. Nigam B., Dubey R. S., Rathore D. Protective role of exogenously supplied salicylic acid and PGPB (*Stenotrophomonas* sp.) on spinach and soybean cultivars grown under salt stress // *Sci. Hortic.* – 2022. – Vol. 293. – Art. 110654. doi: 10.1016/j.scienta.2021.110654.
 16. Pahari A., Pradhan A., Nayak S.K., Mishra B.B. «Bacterial siderophore as a plant growth promoter» in microbial biotechnology: Volume 1. Applications in agriculture and environment. Eds. Patra J.K., Vishnuprasad C.N., Das G. – Singapore: Springer, 2017. – P. 163–180.
 17. Singh R.P., Jha P.N. The PGPR *Stenotrophomonas maltophilia* SBP-9 augments resistance against biotic and abiotic stress in wheat plants // *Front. Microbiol.* – 2017. – Vol. 8. – 1945. doi: 10.3389/fmicb.2017.0194.
 18. Svensson-Stadler L.A., Mihaylova S.A., Moore E.R. *Stenotrophomonas* interspecies differentiation and identification by *gyrB* sequence analysis // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2012. – Vol. 327. – No. 1. – P. 15–24.
 19. Ulrich K., Kube M., Becker R., Schneck V., Ulrich A. Genomic analysis of the endophytic *Stenotrophomonas* strain 169 reveals features related to plant-growth promotion and stress tolerance // *Front. Microbiol.* – 2021. – Vol. 12. – Art. 687463. doi: 10.3389/fmicb.2021.687463.
 20. Woźniak M., Gałazka A., Tyśkiewicz R., Jaroszek-Ścisieł J. Endophytic bacteria potentially promote plant growth by synthesizing different metabolites and their phenotypic/physiological profiles in the biolog gen iii Microplate™ test // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20. – Art. 5283. doi: 10.3390/ijms20215283.
- PLoS One 2019; 14:e0222405. doi: 10.1371/journal.pone.0222405.
5. Alexander A, Singh V K, Mishra A. Halotolerant PGPR *Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 induces salt tolerance by modulating physiology and biochemical activities of *Arachis hypogaea*. *Front Microbiol* 2020; 11:568289. doi: 10.3389/fmicb.2020.568289.
 6. Bashandy SR, Abd-Alla MH, Dawood MFA. Alleviation of the toxicity of oily wastewater to canola plants by the N₂-fixing, aromatic hydrocarbon biodegrading bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* SR1. *Appl Soil Ecol* 2020; 154:103654. doi: 10.1016/j.apsoil.2020.103654.
 7. Ben Abdallah RA, Jabnoun-Khiareddine H, Nefzi A, Daami-Remadi M. Evaluation of the growth-promoting potential of endophytic bacteria recovered from healthy tomato plants. *J Hortic* 2018; 5:1000234. doi: 10.4172/2376-0354.1000234.
 8. Fan R, Xie W, Ma H, Zhu M, Ma K, Yan X. Isolation of cadmium-resistant microbial strains and their immobilization of cadmium in soil. *Biodegradation* 2023; 34(5):445–459.
 9. Ghavami N, Alikhani H A, Pourbabaei AA, Besharati H. Effects of two new siderophore-producing rhizobacteria on growth and iron content of maize and canola plants. *Journal of Plant Nutrition* 2017; 40(5):736–746.
 10. Guerrieri MC, Fanfoni E, Fiorini A, Trevisan M, Puglisi E. Isolation and screening of extracellular PGPR from the rhizosphere of tomato plants after long-term reduced tillage and cover crops. *Plants* 2020; 9(5):668. doi: 10.3390/plants9050668.
 11. Huda N, Tanvir R, Badar J, Ali I, Rehman Y. Arsenic-resistant plant growth promoting *Pseudoxanthomonas mexicana* S254 and *Stenotrophomonas maltophilia* S255 isolated from agriculture soil contaminated by industrial effluent. *Sustainability* 2022; 14:10697. doi: 10.3390/su141710697.
 12. Khakimova L, Chubukova O, Verzhinina Z, Maslennikova D. Effects of *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1 on growth and tolerance to cadmium stress in *Pisum sativum* L.. *BioTech* 2023; 12:5. doi: 10.3390/biotech12010005.
 13. Kumar A, Rithesh L, Kumar V, Raghuvanshi N, Pandey AK. *Stenotrophomonas* in diversified cropping systems: friend or foe? *Front Microbiol* 2023; 14:1214680. doi: 10.3389/fmicb.2023.1214680.
 14. Liaquat F, Munis MFH, Arif S et al. Cd-tolerant SY-2 strain of *Stenotrophomonas maltophilia*: A potential PGPR, isolated from the Nanjing mining area in China. *Biotech* 2020; 10(12):519. doi: 10.1007/s13205-020-02524-7.
 15. Nigam B, Dubey R S, Rathore D. Protective role of exogenously supplied salicylic acid and PGPB (*Stenotrophomonas* sp.) on spinach and soybean cultivars grown under salt stress. *Sci Hortic* 2022; 293:110654. doi: 10.1016/j.scienta.2021.110654.
 16. Pahari A, Pradhan A, Nayak SK, Mishra BB. «Bacterial siderophore as a plant growth promoter» in microbial biotechnology: Volume 1. Applications in agriculture and environ-

References

1. Korshunova TYU, Bakayeva MD, Kuzina YeV, Rafikova GF, Chetverikov SP, Chetverikova DV, Loginov ON. Rol' bakteriy roda *Pseudomonas* v ustoychivom razvitii agrosistem i zashchite okruzhayushchey sredy (obzor). *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* 2021; 57(3):211–227 (in Russian).
2. Khakimova LR, Chubukova OV, Muryasova AR, Verzhinina ZR. Vliyaniye shtamma *Pseudomonas* sp. OBA 2.4.1 na rasteniya gorokha posevnogo (*Pisum sativum* L.) pri ingibiruyushchem deystvii soley kadmiya. *Biomika* 2022; 14(2):101–110 (in Russian).
3. Chubukova OV, Khakimova LR, Akimova YeS, Verzhinina ZR. Filogeniya i svoystva novykh shtammov *Pseudomonas* sp. iz rizosfery bobovykh rasteniy Yuzhnogo Urala. *Mikrobiologiya* 2022; 91(5):537–546 (in Russian).
4. Alexander A, Singh V K, Mishra A, Jha B. Plant growth promoting rhizobacterium *Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 augments endurance against N₂ starvation by modulating physiology and biochemical activities of *Arachis hypogaea*.

- ment. Eds Patra JK, Vishnuprasad CN, Das G. Singapore: Springer, 2017: 163–180.
17. Singh RP, Jha PN. The PGPR *Stenotrophomonas maltophilia* SBP-9 augments resistance against biotic and abiotic stress in wheat plants. *Front Microbiol* 2017; 8:1945; doi: 10.3389/fmicb.2017.0194.
18. Svensson-Stadler LA, Mihaylova SA, Moore ER. *Stenotrophomonas* interspecies differentiation and identification by *gyrB* sequence analysis. *FEMS Microbiol Lett* 2012; 327(1):15–24.
19. Ulrich K, Kube M, Becker R, Schneck V, Ulrich A. Genomic analysis of the endophytic *Stenotrophomonas* strain 169 reveals features related to plant-growth promotion and stress tolerance. *Front Microbiol* 2021; 12:687463. doi: 10.3389/fmicb.2021.687463.
20. Woźniak M, Gałazka A, Tyśkiewicz R, Jaroszek-Ścisł J. Endophytic bacteria potentially promote plant growth by synthesizing different metabolites and their phenotypic/physiological profiles in the biolog gen iii Microplate™ test. *Int J Mol Sci* 2019; 20:5283. doi: 10.3390/ijms20215283.

CHARACTERISTICS AND GROWTH PROMOTIONAL PROPERTIES OF A NEW STRAIN OF BACTERIA OF THE GENUS *STENOTROPHOMONAS* SP.

L.R. KHAKIMOVA^{1,3}, O.V. CHUBUKOVA^{1,2}, E.S. AKIMOVA¹, Z.R. VERSHININA^{1,2}

¹*Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,*

²*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Ufa State Petroleum Technological University» (USPTU), Department of molecular technologies,* ³*Bashkir State Medical University (BSMU), Ufa*

Bacteria of the *Stenotrophomonas* sp. have a wide range of functional properties that allow them to be used to combat pests and pathogens, as well as to stimulate the growth of various plants. Certain effective strains can potentially become the basis for the creation of biofertilizers. The purpose of this study was to describe the growth-promoting properties of the rhizosphere strain *Stenotrophomonas* sp. OBA 2.13. As a result, the studied strain showed its positive PGPR properties, manifested in increasing the energy of seed germination and improving the growth of roots of pea plants (*Pisum sativum* L.) even under cadmium stress. At the same time, the bacterial strain showed resistance to CdCl₂ in a medium of up to 0.3 mM, and positive phosphate-mobilizing and siderophore activities. Treatment with *Stenotrophomonas* sp. OBA 2.13 enhanced the growth of roots of pea seedlings by 30.9%, and in the presence of 0.25 mM CdCl₂, the growth of roots of plants treated with bacteria slowed down, but was better than that of seeds without treatment by 34.3%. The data obtained show that such growth-promoting *Stenotrophomonas* sp. can be used to create effective biological products to protect agricultural plants from the effects of heavy metals and for use in the reclamation of arable land.

Keywords: PGPR, *Stenotrophomonas* sp., 16S rRNA gene, phosphate-mobilizing activity, siderophores, cadmium.

Address:

Vershinina Z.R., Ph.D. Biol. Sciences
senior researcher at the Institute of biochemistry and genetics,
UFIC RAS, associate professor of the department, School
of Molecular Technologies, Ufa State Petroleum Technical
University (USPTU)
E-mail: zilyaver@mail.ru

Для цитирования:

Хакимова Л.Р., Чубукова О.В., Акимова Е.С., Вершинина З.Р. Характеристика и ростостимулирующие свойства нового штамма бактерий рода *Stenotrophomonas*. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2024; 20(1):48–54.

For citation:

Khakimova L.R., Chubukova O.V., Akimova E.S., Vershinina Z.R. Characteristics and growth promotional properties of a new strain of bacteria of the genus *Stenotrophomonas* sp. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(1):48–54 (in Russian).

РАЗРАБОТКА ИНФОРМАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ АНАЛИЗА И ПРОТОКОЛИРОВАНИЯ ПРОЦЕССА ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ

Р.Р. САЛИХОВ^{1*}, О.А. ВОЛОХ^{1,2}, С.В. БОРИСОВА¹, В.Р. ВОЛЬНИКОВ¹,
Е.М. КУЗНЕЦОВА¹, А.К. НИКИФОРОВ^{1,2}

¹ ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора,
² ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени
Н.И. Вавилова», Саратов

Разработана база данных (БД) для протоколирования аппаратного глубинного культивирования производственных и вакцинных штаммов микроорганизмов в экспериментальной работе и практике получения иммунобиологических препаратов. Цель создания БД состоит в накоплении, структурировании, обработке, анализе, предоставлении информации о ключевых аспектах культивирования. БД является пополняемой, несет в себе сведения о культивировании патогенных биологических агентов (ПБА) II–IV групп патогенности. БД содержит информацию о культивируемом микроорганизме, питательной среде, оборудованию, вносимым растворам, способах подготовки инокулята, основным параметрам отдельно взятого культивирования. С помощью БД обобщаются расчет показателей роста культуры и результирующие итоги культивирования, визуализируется изменение ключевых параметров процесса в течение времени. Архитектура БД потенциально реализуема в любой современной СУБД реляционного типа. Область применения БД – микробиология, биотехнология, фармакология.

Ключевые слова: база данных, глубинное периодическое культивирование, системы протоколирования и анализа.

Введение

Один из ключевых этапов получения препаратов, используемых в лабораторной диагностике возбудителей особо опасных инфекционных заболеваний, относится к процессу глубинного периодического культивирования. Сложность и вариативность данной категории процессов приводят к накоплению большого объема данных, что, в свою очередь, обуславливает необходимость в создании систем, обеспечивающих, кроме непосредственного хранения данных, возможность быстрого и удобного поиска, а также в анализе требуемой информации.

Проведенный информационный поиск показывает, что большинство биологических баз данных, представленных в открытом доступе, имеет узкую направленность и предназначено для предоставления результатов, полученных различными исследователь-

скими группами [4]. Или же они направлены на отдельные биотехнологические аспекты культивирования микроорганизмов, например, на систематизацию и подбор питательных сред [9, 10]. Имеются сведения об информационных системах для подбора условий культивирования клеток млекопитающих и микроорганизмов, систематизации информации, получаемой в ходе экспериментов [1–3]. Однако, несмотря на острую практическую необходимость подобных систем в экспериментальной и производственных практиках, подобного рода структуры не получили широкого распространения.

Коммерческие БД, интегрированные в состав ПО управляющего блока аппарата культивирования, как правило, служат только для протоколирования кинетических параметров культивирования и слабо применимы для манипуляций с разнородными и сложноорганизованными информационными объектами, неизбежно возникающими при попытке адекватно описать отдельно взятый процесс выращивания.

То есть ясно, что создание систем подобного рода непосредственно под процесс культивирования является актуальным. Представить процесс глубинного культивирования в виде информационно-логической модели

© 2024 г. Салихов Р.Р., Волох О.А., Борисова С.В., Вольников В.Р., Кузнецова Е.М., Никифоров А.К.

* Автор для переписки:

Салихов Руслан Римович

младший научный сотрудник ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

E-mail: salihow.ruslan2017@yandex.ru

с адекватной организацией ее структуры позволяет использование баз данных реляционного типа.

Особенно острая необходимость в протоколировании процесса с возможностью анализа полученной информации обнаруживается при получении иммунобиологических препаратов (ИБП), так как возникает потребность в точном отслеживании всех этапов процесса, ключевым из которых служит процесс культивирования.

На сегодняшний день ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» осуществляет выпуск ряда иммунобиологических препаратов, процесс получения которых связан с глубинным периодическим культивированием бактериальных штаммов-продуцентов. С целью оптимизации процесса культивирования бактерий в экспериментальных и производственных условиях было принято решение о создании информационно-аналитического комплекса, дающего возможность систематизировать и анализировать информацию о процессах аппаратного глубинного культивирования микроорганизмов.

Материалы и методы

Для создания базы данных применяли пакет Microsoft Access. В качестве данных для заполнения использовались протоколы экспериментальных и производственных выращивания штаммов-продуцентов, применяемых в производстве иммунобиологических препаратов: *Vibrio cholera* 569 В, М-41; *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ; *Yersinia pestis* EV НИИЭГ; *Yersinia pseudotuberculosis* 6, 31, 68, 69, 70.

Результаты и обсуждение

На сегодняшний день существуют три типа организации баз данных: сетевая, иерархическая и реляционная. Для создания настоящей базы данных нами была выбрана реляционная модель, позволяющая адекватно описать такой сложноорганизованный процесс, как культивирование.

Реляционная модель основана на математическом понятии «отношение», физическим представлением которого является «таблица». Отношение имеет вид двумерной таблицы, в которой строки соответствуют отдельным записям, а столбцы — атрибутам. Каждый объект такой модели имеет уникальный первичный ключ, идентифицирующий каждую запись в таблице. Две записи в таблице не могут иметь одинаковых первичных ключей. Связь между отдельными таблицами БД осуществляется с использованием внешних ключей (рис. 1).

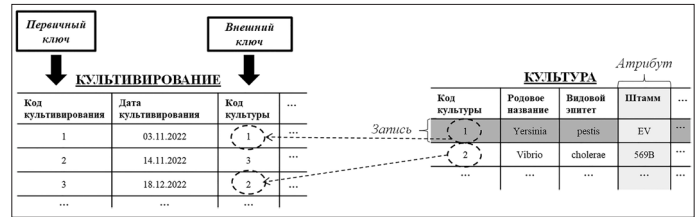


Рис. 1. Структурная организация объектов реляционной базы данных на примере отношения таблиц «Культивирование» и «Культура»

Проектирование БД проводили согласно общепринятым этапам: концептуальное проектирование, логическое проектирование, физическое проектирование [6].

На этапе концептуального проектирования осуществляли исследование предметной области, устанавливали сущности будущей БД, определяли функциональные зависимости между ними. На основании этого создавали образ моделируемой предметной области — ER модель (рис. 2).

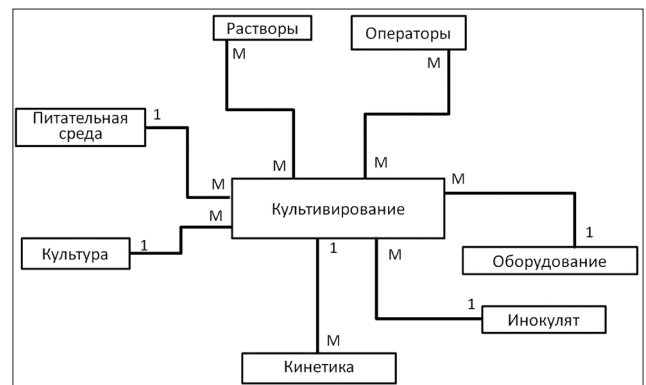


Рис. 2. ER-модель процесса глубинного культивирования бактерий

Далее делали преобразование концептуальной модели в логическую. Для каждой сущности ER-модели создавали таблицу, осуществляли формирование структуры таблиц, устанавливали связи необходимых типов между таблицами с использованием первичных и вторичных ключей. Кроме того, выполняли нормализацию созданной БД. Краткая характеристика таблиц представлена в таблице 1.

На этапе физического проектирования осуществляли преобразование логической модели в форму реализуемой в среде выбранной СУБД. В качестве СУБД нами был выбран пакет Microsoft Access. Работа с созданным файлом БД возможна и при использовании стороннего ПО, в том числе и распространяемого под свободной лицензией, что значительно облегчает использование БД. Кроме того, организовать БД, подобную настоящей, вполне возможно практически в любой реляционной СУБД современного типа.

Структурная организация таблиц созданной БД

| Название таблицы | Ключевые аспекты, отражаемые в таблице |
|------------------|--|
| КУЛЬТУРА | Предоставляет полную информацию о классификации и свойствах культивируемого микроорганизма |
| СРЕДА | Содержит сведения о наименовании питательной среды, ее физико-химических свойствах |
| ОБОРУДОВАНИЕ | Несет информацию об аппаратной составляющей процесса культивирования |
| ИНОКУЛЯТ | Содержит протоколы подготовки посевной культуры |
| РАСТВОРЫ | Несет информацию о вносимых растворах в ходе культивирования |
| ОПЕРАТОРЫ | Содержит сведения об операторах культивирования |
| КУЛЬТИВИРОВАНИЕ | Информирует об отдельно взятом культивировании, объединяет сведения, содержащиеся в других таблицах |
| КИНЕТИКА | Содержит сведения об изменении роста культуры, физико-химических свойств культуральной жидкости, аппаратных параметрах культивирования в течение времени |

После выбора среды разработки подготавливали детальное описание схемы данных с указанием всех типов, полей, размеров и ограничений. Затем проводили организацию структур, обеспечивающих взаимодействие с будущим пользователем, — элементов ввода и редактирования данных, структур анализа и вывода полученной информации.

Дополнительно на рассматриваемом этапе оптимизировали возможность внесения, редактирования ранее введенных данных и получения требуемой информации. Разработка средств защиты БД — ограничение на доступ пользователей, не имеющих соответствующих прав, — что особенно актуально при регламентировании работы с определенными стандартами (GMP) [5].

Подавляющее большинство современных СУБД имеет структуры, оптимизирующие ввод и редактирование данных, что, в свою очередь, позволяет избежать дублирования данных. Этот принцип реализуется при вводе «вариативных значений» путем обращения к соответствующей таблице.

Использование SQL-запросов открывает возможность формировать протоколы (отчеты) культивирования согласно требованиям пользователя. Основу для протокола отдельно взятого культивирования составляет информация из таблиц «Культивирование» и «Кинетика». Протокол содержит данные об основных аспектах культивирования: дата и вариант культивирования, культивируемый микроорганизм, сведения о питательной среде, способе подготовки посевной культуры,

режимах обработки оборудования, вносимых растворах, операторах и итогах культивирования. Дополнительно протокол отражает процесс культивирования в динамике: изменение физико-химических свойств культуральной жидкости, аппаратных параметров, скорости подачи растворов, роста бактериальной культуры. Указанные параметры визуализированы графически (рис. 3).

Согласно общепринятым методам, рассчитываются ключевые показатели роста культуры: удельная скорость роста (μ), время удвоения биомассы (td), число генераций (n) [7]. С использованием функций суммирования, поиска экстремумов формируется соподчиненный отчет по результирующим итогам.

Наряду с протоколированием данных, получаемых в процессе культивирования, база данных может быть использована для анализа информации о влиянии множества факторов на конечный результат культивирования. Для этого осуществляют формирование выборки с выводом интересующих параметров с последующей фильтрацией и сортировкой результирующих значений. Кроме того, исходя из полученных результатов, возможно определение «эталонного протокола» для дальнейшего использования на экспериментальных или производственных площадках. Кроме указанных протоколов, требуется формирование отчетов согласно потребностям пользователя, отражающих как сведения о совокупности культивирований, так и отдельных аспектов процесса (расход материальных средств, паспорт культивируемого микроорганизма, паспорт питательной среды и т.д.

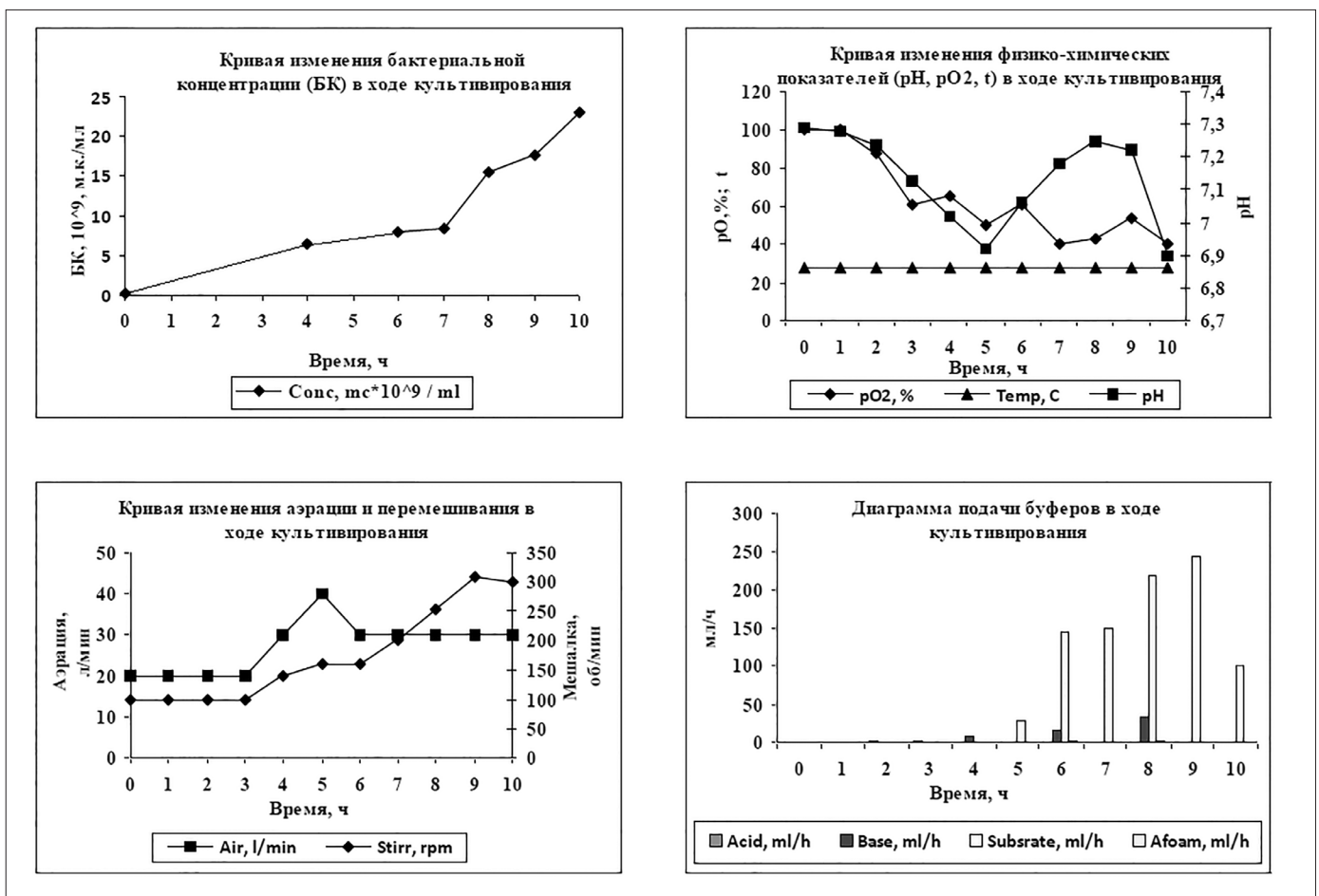


Рис. 3. Пример графического представления изменения ключевых этапов культивирования в ходе процесса

Заключение

Разработанная база данных «Система протоколирования и анализа результатов процесса аппаратного глубинного культивирования бактерий» зарегистрирована в ФИПС, (Свидетельство о регистрации БД № RU 2023622431) [8].

Предлагаемая БД позволяет обеспечить:

1. Надежное хранение информации в целом об отдельном культивировании как в совокупности культивирований, так и в виде конкретных составляющих аспектов отдельных процессов.
2. Возможность быстрого и удобного поиска информации.
3. Создание отчетов (протоколов) с возможностью визуализации различных элементов культивирования (протоколы: культивирования, микроорганизма, питательной среды и т.д.).

Отличительная особенность указанной БД заключается в доступности процессов внесения, обработки, отображения информации о кинетике культивирования, то есть имеется возможность проводить анализ не только

по итогам культивирования, но и детально отслеживать каждый этап выращивания. Предлагаемая схема БД потенциально применима для описания и хранения информации практически любого глубинного культивирования.

Литература

1. База данных «Microbes» № 2013620895. заявл. 28.02.2013. опублик. 20.09.2103 / Вечерковская М.Ф., Тец В.В.
2. Батыргазиева Д.Р., Архипова О.О., Нохаева В.С. Разработка сетевой базы данных в области культивирования микроорганизмов с использованием веб-интерфейса // Успехи в химии и химической технологии. — 2019. — Т. 33. — № 11(221). — С. 15–17.
3. Батыргазиева Д.Р., Гусева Е.В., Меньшуткина Н.В. Информационная система для подбора условий и оборудования при культивировании клеток млекопитающих // Вестник ВГУИТ. — 2017. — Т. 79. — № 4. — С. 65–70.
4. Вечерковская М.Ф., Тец В.В. Создание базы данных для решения задач по систематизации результатов опытов, проводимых в ходе научных исследований в микробиологии // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. — 2015. — Т. XXII. — № 2. — С. 64–67.

- ГОСТ Р 52249-2009 Правила производства и контроля качества лекарственных средств (Good manufacturing practice for medicinal products (GMP)) [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200071754> (дата обращения: 03.03.2023).
- Конолли Т., Бегг К. Базы данных. Проектирование, реализация и сопровождение. Теория и практика. 3-е издание. Пер. с англ. — М.: Издательский дом «Вильямс», 2003. — 1440 с.
- Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. — М: «Мир». 1978. — 321 с.
- Система протоколирования и анализа результатов процесса аппаратного глубинного культивирования бактерий. № RU 2023622431: заявл. 03.07.2023; опубл. 17.07.2023 / Салихов Р.Р., Волох О.А., Кузнецова Е.М. и др.
- Электронный справочник по рецептуре микробиологических питательных сред для возбудителей особо опасных инфекций с учетом количества и компонентного состава при их приготовлении: № 2018620427: заявл. 10.04.2018; опубл. 18.05.2018 / А.Д. Белоусов, Н.И. Вахрушина, М.В. Антонычева и др.
- Koblitz J., Halama P., Spring S., Thiel V., Baschien C., Hahnke R.L., Pester M., Overmann J., Reimer L.C. MediaDive: the expert-curated cultivation media database // *Nucleic Acids Res.* — 2023. — Vol. 51(D1). — D1531–D1538. doi: 10.1093/nar/gkac803.
- organizmov s ispol'zovaniyem veb-interfeysa. *Uspekhi v khimii i khimicheskoy tekhnologii* 2019; 33(11):15–17 (in Russian).
- Batyrgaziyeva DR, Guseva YeV, Men'shutina NV. Informatsionnaya sistema dlya podbora usloviy i oborudovaniya pri kul'tivirovaniy kletok mlekopitayushchikh. *Vestnik VGUIT* 2017; 79(4):65–70. (in Russian).
- Vecherkovskaya MF, Tets VV. Cozdaniye bazy dannykh dlya resheniya zadach po sistematzatsii rezul'tatov opytov, provodimykh v khode nauchnykh issledovaniy v mikrobiologii. *Uchenyye zapiski SPbGMU im akad IP Pavlova* 2015; XXII(2):64–67 (in Russian).
- GOST R 52249-2009 Pravila proizvodstva i kontrolya kachestva lekarstvennykh sredstv (Good manufacturing practice for medicinal products (GMP)) URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200071754> (data obrashcheniya: 03.03.2023).
- Konolli T, Begg K. Bazy dannykh. Proyektirovaniye, realizatsiya i soprovozhdeniye. Teoriya i praktika. 3-ye izdaniye. Per. s angl. Moscow: Izdatel'skiy dom «Vil'yame», 2003: 1440 (in Russian).
- Pert SDzh. Osnovy kul'tivirovaniya mikroorganizmov i kletok. Moscow: «Mir». 1978: 321 (in Russian).
- Sistema protokolirovaniya i analiza rezul'tatov protsessa apparatnogo glubinnogo kul'tivirovaniya bakteriy. № RU 2023622431: yayavl. 03.07.2023: opubl 17.07.2023. Salikhov RR, Volokh OA, Kuznetsova YeM i dr (in Russian).
- Elektronnyy spravochnik po retsepture mikrobiologicheskikh pitatel'nykh sred dlya vzbuditeley osobo opasnykh infektsiy s uchetom kolichestva i komponentnogo sostava pri ikh prigotovlenii: № 2018620427: yayavl 10.04.2018: opubl. 18.05.2018. AD Belousov, NI Vakhrushina, MV Antonycheva i dr (in Russian).
- Koblitz J, Halama P, Spring S, Thiel V, Baschien C, Hahnke RL, Pester M, Overmann J, Reimer LC. MediaDive: the expert-curated cultivation media database. *Nucleic Acids Res* 2023; 51(D1): D1531–D1538. doi: 10.1093/nar/gkac803.

References

DEVELOPMENT OF AN INFORMATION SYSTEM FOR ANALYZING AND LOGGING THE PROCESS OF SUBMERGED CULTIVATION OF BACTERIA

R.R. SALIKHOV¹, O.A. VOLOKH^{1,2}, S.V. BORISOVA¹, V.R. VOL'NIKOV¹,
E.M. KUZNETSOVA¹, A.K. NIKIFOROV^{1,2}

¹ Federal State Scientific Institution «Russian Anti-Plague Institute «Microbe» of the Rosпотребнадзор,

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov», Saratov

A database (DB) for logging the process of hardware-controlled submerged cultivation of industrial and vaccine strains of microorganisms in experimental work and practice of obtaining immunobiological preparations has been developed. The purpose of creating the database is to accumulate, structure, process, analyze, and provide information regarding key aspects of cultivation. The database is continuously updated and contains evidence on the cultivation of pathogenic biological agents of pathogenicity groups

II–IV. The database holds information on the cultivated microorganism, nutrient medium, equipment, applied solutions, methods of inoculum preparation, and the main parameters of a specified cultivation. Using the database, culture growth indicators and the resulting cultivation results are calculated; changes in key process parameters over time are visualised. The database architecture is potentially implementable in any modern relational DBMS. The scope of the database application is microbiology, biotechnology, pharmacology.

Keywords: database, submerged batch cultivation, logging and analysis systems.

Address:

Salikhov R.R.

Junior researcher of the Russian anti-plague institute

«Microbe» of Rosпотребнадзор

E-mail: salihov.ruslan2017@yandex.ru

Для цитирования:

Салихов Р.Р., Волох О.А., Борисова С.В., Вольников В.Р., Кузнецова Е.М., Никифоров А.К. Разработка информационной системы для анализа и протоколирования процесса глубинного культивирования бактерий. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2024; 20(1):55–60.

For citation:

Salikhov R.R., Volokh O.A., Borisova S.V., Vol'nikov V.R., Kuznetsova E.M., Nikiforov A.K. Development of an information system for analyzing and logging the process of submerged cultivation of bacteria. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(1):55–60 (in Russian).

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА КРИОПРОТЕКТОРОВ НА СТАБИЛЬНОСТЬ АНАЛИТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ЛИОФИЛИЗАЦИИ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO* «СЫВОРОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ХОЛЕРНАЯ НЕ О1 ГРУППЫ О139 АДсорБИРОВАННАЯ КРОЛИЧЬЯ ДЛЯ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ НА СТЕКЛЕ»

М.В. ОВЧИННИКОВА, А.С. ФЕСЬКОВА*, И.В. ШУЛЬГИНА, О.А. ЛОБОВИКОВА,
Л.В. ЗАЙЦЕВА, Т.Ю. КИРИЛЛОВА, А.В. КОМИССАРОВ, А.К. НИКИФОРОВ

ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

В работе рассматривается возможность применения различных вариантов криопротекторов при производстве медицинского изделия для *in vitro* диагностики «Сыворотка диагностическая холерная не О1 группы О139 адсорбированная кроличья для реакции агглютинации на стекле» в целях снижения рисков ухудшения нормативных показателей качества препарата при проведении сублимационного высушивания препарата и его последующего долгосрочного хранения. С учетом долговременного опыта были подобраны среды высушивания, содержащие в разных сочетаниях такие защитные компоненты, как пептон, хлорид натрия, желатин, сахарозу и трегалозу. Использовали специальную диагностическую сыворотку. Процесс лиофилизации проводили в стандартных условиях. Также реализованы отработанные режимы замораживания и высушивания.

Ключевые слова: защитные среды, диагностические сыворотки, лиофилизация, аналитическая чувствительность, специфичность.

Введение

Лабораторная диагностика холеры имеет важнейшее значение в комплексе противоэпидемических мероприятий и несмотря на разнообразие методов исследования объектов окружающей среды с целью обнаружения холерных вибрионов, актуальной и востребованной остается реакция агглютинации (РА) на стекле. ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора является производителем медицинского изделия для диагностики *in vitro* (МИ ИВД) «Сыворотка диагностическая холерная не О1 группы О139 адсорбированная кроличья для реакции агглютинации (РА) на стекле, лиофилизат приготовления раствора для диагностических целей», которое использу-

ется при проведении мониторинга объектов окружающей среды и исследовании клинического материала от подозрительных на холеру больных. МИ ИВД представляет собой сыворотку крови кроликов, иммунизированных корпускулярным антигеном штамма *Vibrio cholerae* О139, инактивированного нагреванием. Препарат выпускается в виде лиофилизата для приготовления раствора для диагностических целей.

Лиофилизация или сублимационное высушивание — это процесс удаления влаги из продукта путем прямого перехода из твердого состояния в газообразное. Он применяется для сохранения биологических, физико-химических свойств. В настоящее время процесс лиофилизации сыворотки холерной не О1 группы О139 не предусматривает использование защитных веществ. Сублимационное высушивание препарата является критическим технологическим этапом, несущим риски ухудшения диагностических свойств сыворотки. В частности, нами в ряде случаев отмечено разрушение «таблетки» продукта после сушки, что предопределяло его отбраковку по показателю «внешний вид».

Оптимизация технологических аспектов лиофилизации и непосредственно подбора защитных веществ

© 2024 г. Овчинникова М.В., Феськова А.С., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Зайцева Л.В., Кириллова Т.Ю., Комиссаров А.В., Никифоров А.К.

* **Автор для переписки:**

Феськова Анна Сергеевна

научный сотрудник отдела стандартизации, качества и метрологии,
ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

E-mail: Feskovaas@yandex.ru

— крио- и лиопротекторов, исходя из физико-химических свойств продукта лиофилизации, определяет один из путей снижения рисков на неотъемлемой стадии производства, указанного МИ ИВД [2].

Как правило, вид продукта определяет выбор защитной среды. Однако существуют общие требования, которые предъявляются ко всем видам протективных веществ. Среда стабилизации должна обеспечивать эффективную защиту от всех известных угроз и рисков, а также должна быть надежной и стабильной, чтобы гарантировать качество препарата в течение длительного времени. Важна простота использования выбранного компонента, его гибкость и масштабируемость для адаптации к изменяющимся потребностям и условиям. Защитная среда должна соответствовать современным стандартам безопасности [4].

Для конструирования защитных сред при лиофилизации применяются различные сахара (сахароза, глюкоза, трегалоза), коллоиды (желатин, агар, пептон, молоко и сыворотки), соли (глутамат натрия, натрия хлорид) и т.д. Использование композитных защитных сред, как показывают экспериментальные исследования и практический опыт, обеспечивает более высокую защиту от воздействия повреждающих факторов [1, 5].

В связи с этой целью нашей работы являлось изучение влияния компонентного состава защитных сред высушивания на стабильность аналитических показателей при проведении лиофилизации сыворотки холерной не О1 группы О139 и при ее длительном хранении.

Материалы и методы

В эксперименте использовали полуфабрикат сыворотки холерной не О1 группы О139 адсорбированной.

Учитывая данные литературы, а также многолетний практический опыт производства МИ ИВД в ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, для лиофилизации сыворотки диагностической холерной не О1 группы О139 были подобраны среды высушивания, содержащие в разных сочетаниях такие защитные компоненты, как пептон, натрия хлорид, желатин, сахарозу и трегалозу. Путем добавления предложенных криопротекторов к образцам сывороточного препарата сформировали пять экспериментальных вариантов для проведения лиофилизации: пептон; натрия хлорид и желатин; пептон и желатин; натрия хлорид, желатин и сахароза; натрия хлорид, желатин

и трегалоза — варианты 1, 2, 3, 4, 5 соответственно. Контроль — сыворотка холерная не О1 группы О139 без стабилизаторов. В целях получения статистически достоверных результатов все эксперименты проводили в трех повторностях.

Лиофилизацию осуществляли на установке Martin Christ Epsilon 2-6D (Германия).

Процесс лиофилизации проходил в стандартном режиме, который используется при производстве коммерческих МИ ИВД на основе сывороток. Замораживание проводили при температуре препарата минус 55 ± 5 °С. Время выдерживания экспериментальных образцов в низкотемпературном холодильнике до начала высушивания составляло не более 70 ± 2 ч. Режим высушивания проводили в соответствии с графиком (рис. 1), в течение 22–26 ч. [3].

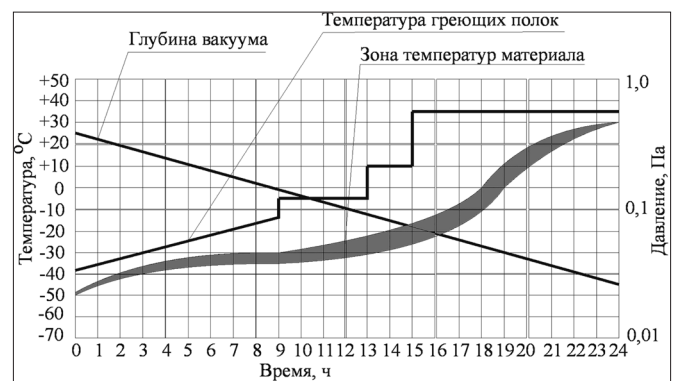


Рис. 1. Режим высушивания

В течение 15–20 ч после начала высушивания температура материала переходила нулевую отметку и в конце высушивания составляла 30 ± 2 °С. Ампулы с сухими сыворотками запаивали в среде осушенного стерильного воздуха при нормальном атмосферном давлении.

После лиофилизации экспериментальные образцы проверяли по следующим показателям качества: внешний вид, растворимость, рН, потеря в массе при высушивании, герметизация, микробиологическая чистота, аналитическая чувствительность и специфичность.

С целью определения влияния криопротекторов на стабильность медицинского изделия для диагностики *in vitro* в течение установленного срока годности использовали метод «ускоренного старения». Данный метод заключался в выдерживании испытуемых образцов при температуре и влажности, превышающих температуру и влажность их хранения в процессе обращения. В таких условиях ускоряются протекающие в экспериментальных образцах физико-химические процессы, приводящие со временем к нежелательным изменениям качества.

Результаты и обсуждение

В ходе работы было определено, что только образцы 3, 4, 5 сыворотки диагностической холерной О139 соответствовали требованиям технических условий (ТУ). Полученные лиофилизаты и контрольный образец в ампулах представляли собой аморфную массу серовато-белого цвета, полностью растворяющуюся в 1 мл дистиллированной воды в течение 5 мин, после растворения — прозрачную жидкость светло-желтого цвета. Величина рН — в пределах от 6,8 до 7,6, потеря в массе при высушивании не превышала 2%, ампулы

с препаратом были герметичны, микробиологическая чистота — не более 20 колоний сапрофитов на чашке. Определение аналитической чувствительности и специфичности показало, что экспериментальные сыворотки и контрольный образец в разведении 1:10 агглютинировали в реакции на стекле штаммы *V. cholerae* О139 не менее, чем на 3 креста и не агглютинировали штаммы *V. cholerae* О1 и не О1 серогрупп. Экспериментальный материал 1, 2 вариантов не отвечал заявленным требованиям, о чем свидетельствуют результаты, представленные в таблице 1. Это дало основание не использовать данные образцы в последующем исследовании.

Таблица 1

Оценка соответствия контрольного и экспериментальных образцов сыворотки диагностической холерной О139 требованиям технических условий

| Наименование показателя | Характеристика и нормы | Образцы сыворотки диагностической холерной О139 | | | | | |
|--|---|---|---|---|---|---|---|
| | | КО* | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Внешний вид | Аморфная масса серовато-белого цвета | + | - | - | + | + | + |
| Растворимость | Содержимое ампулы должно полностью растворяться в 1 мл дистиллированной воды при встряхивании в течение 5 мин. После растворения — прозрачная жидкость светло-желтого цвета. Допускается легкая опалесценция | + | + | - | + | + | + |
| рН | От 6,8 до 7,6 | + | - | - | + | + | + |
| Потеря в массе при высушивании | Не более 2 % | + | - | - | + | + | + |
| Герметизация | Ампулы с сывороткой должны быть герметичны | + | + | + | + | + | + |
| Микробиологическая чистота | Допускается рост не более 20 колоний сапрофитов на одной чашке Петри при высеве 0,1 мл сыворотки | + | + | + | + | + | + |
| Аналитическая чувствительность и специфичность | Сыворотка в разведении 1:10 должна агглютинировать в РА на стекле штаммы <i>V. cholerae</i> О139 серогруппы не менее, чем на 3 креста и не должна агглютинировать штаммы <i>V. cholerae</i> О1 и не О1 других серогрупп в S-форме | + | - | - | + | + | + |

Примечание: * — контрольный образец, ** — соответствует нормам, *** — не соответствует нормам

В соответствии с порядком проведения теста «ускоренного старения» экспериментальные варианты сыворотки и контрольный образец выдерживали при температуре 41 °С. Через установленное время (с интервалом 15 дней) лиофилизированные препараты

МИ ИВД проверяли по показателям качества. Общая продолжительность теста составила 3,5 месяца, что соответствовало 7 годам экспериментального срока годности препарата. Результаты данного исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2

**Показатели качества контрольного и экспериментальных образцов сыворотки
диагностической холерной O139 в тесте «ускоренное старение»**

| Образец | Срок годности экспериментального хранения (сутки) | Срок годности | Наименование показателя | | | |
|---------|---|---------------|---|---|---|--|
| | | | Внешний вид: аморфная масса серовато-белого цвета | Растворимость: содержимое ампулы должно полностью растворяться в 1 мл дистиллированной воды при встряхивании в течение 5 мин. После растворения — прозрачная жидкость светло-желтого цвета. Допускается легкая опалесценция | Аналитическая чувствительность: Сыворотка в разведении 1:10 должна агглютинировать в РА на стекле штаммы <i>V. cholerae</i> O139 серогруппы не менее, чем на 3 креста | Специфичность: сыворотка в разведении 1: 10 не должна агглютинировать штаммы <i>V.cholerae</i> O1 и не O1 других серогрупп в S-форме |
| КО | 15 | 1 год | +* | + | + | + |
| | 30 | 2 года | + | + | + | + |
| | 45 | 3 года | + | + | + | + |
| | 60 | 4 года | + | + | + | + |
| | 75 | 5 лет | + | + | + | + |
| | 90 | 6 лет | + | + | +/- | + |
| | 105 | 7 лет | + | + | -** | + |
| 3 | 15 | 1 год | + | + | + | + |
| | 30 | 2 года | + | + | + | + |
| | 45 | 3 года | + | + | + | + |
| | 60 | 4 года | + | + | + | + |
| | 75 | 5 лет | + | + | +/- | + |
| | 90 | 6 лет | + | + | - | + |
| | 105 | 7 лет | + | - | - | + |
| 4 | 15 | 1 год | + | + | + | + |
| | 30 | 2 года | + | + | + | + |
| | 45 | 3 года | + | + | + | + |
| | 60 | 4 года | + | + | + | + |
| | 75 | 5 лет | + | + | + | + |
| | 90 | 6 лет | + | + | + | + |
| | 105 | 7 лет | + | + | + | + |
| 5 | 15 | 1 год | + | + | + | + |
| | 30 | 2 года | + | + | + | + |
| | 45 | 3 года | + | + | + | + |
| | 60 | 4 года | + | + | + | + |
| | 75 | 5 лет | + | + | + | + |
| | 90 | 6 лет | + | + | + | + |
| | 105 | 7 лет | + | + | + | + |

Примечание: * «+» соответствует нормам; ** «-» не соответствует нормам

Для оценки эффективности защитных сред и выбора наиболее оптимального компонентного состава протектора было проведено сравнительное изучение диагностической ценности лиофилизированных экспериментальных препаратов с экспериментальным сроком

хранения до 7 лет в отношении 50 штаммов холерного вибриона O139, выделенных на территории РФ в период с 2000 по 2020 гг. и группы штаммов, используемых для контроля специфичности коммерческого препарата (табл. 3).

Таблица 3

Аналитическая чувствительность и специфичность экспериментальных образцов сыворотки холерной не O1 группы O139

| № п/п | Наименование и номер штамма | Срок хранения | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|------------------------------------|---------------|----|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|----|----|
| | | 1 г | | | 3 г | | | 4 г | | | 5 л | | | 6 л | | | 7 л | | |
| | | B3* | B4 | B5 | B3 | B4 | B5 | B3 | B4 | B5 | B3 | B4 | B5 | B3 | B4 | B5 | B3 | B4 | B5 |
| 1 | <i>V. cholerae</i> не O1 O139 Ар-2 | 4** | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 2 | SG-24 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | - | 2 | 4 |
| 3 | SG-25 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 3 | |
| 4 | MDO-12 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 3 | |
| 5 | MDO-25 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 | |
| 6 | VO-15 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 7 | VO-20 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 8 | PO-2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 9 | PO7 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 2 | 3 | 4 | - | 2 | 4 |
| 10 | MO-28 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 11 | 55 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 12 | 62 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 13 | 70 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 14 | 71 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 15 | 88 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 2 | 4 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 16 | 16 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 2 | 4 | 4 | - | 2 | 4 |
| 17 | 61 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 4 | - | 3 | 4 |
| 18 | 62 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 4 | 4 | - | 3 | 4 |
| 19 | 64 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 4 |
| 20 | 89 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 4 |
| 21 | 95 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 |
| 22 | 96 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 4 |
| 23 | 170 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 |
| 24 | 217 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 2 | 4 |
| 25 | 228 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 26 | 230 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 27 | 408 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 |
| 28 | 87(P-17673) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 |
| 29 | 88 (P-17674) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 30 | 163 (P-17788) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 31 | 180 (P-17791) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 32 | 191 (P-17792) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 2 | 4 |
| 33 | 211/1 (P-17793) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 |
| 34 | 238 (P-17819) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 |
| 35 | 144 (P-18439) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 |
| 36 | 188 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 | 2 | - | 4 |
| 37 | 2/33 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 38 | B-34 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 39 | B-145 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 40 | 3/34 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 2 | 4 | 3 | - | 4 |
| 41 | B-27 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 2 | 4 |
| 42 | AS 486 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 43 | AS 497 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 44 | AS 559 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 45 | AS 507 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 46 | AS 514 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 47 | AS 528 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 48 | AS 521 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 49 | AS 536 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 50 | AS 549 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| 51 | <i>V. cholerae</i> O1 1488a | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 52 | 118 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 53 | M-47 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 54 | 7/96 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 55 | <i>V. cholerae</i> не O1 218-68 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 56 | 14821-62 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 57 | 5473-62 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 58 | 1322-69 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 59 | П-258/1099 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 60 | M-296 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 61 | P-1114 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 62 | 357 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 63 | 19131 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 64 | 154 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 65 | 2810/291 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Примечание: * — варианты защитных сред; ** — сыворотки в разведении 1:10 должны агглютинировать в реакции на стекле штаммы *V. cholerae* O139 не менее, чем на 3 креста, и не должны агглютинировать штаммы *V. cholerae* O1 и не O1 серогрупп

Полученные данные, представленные таблице 3, свидетельствовали о сопоставимом защитном эффекте всех трех выбранных сред в течение установленного срока хранения и четырех лет экспериментального хранения. При сроке хранения от 5 до 7 лет наблюдалось незначительное снижение специфической активности у образцов, при лиофилизации которых использовались варианты криопротекторов 4 и 5. Однако максимально протективный эффект оказывал компонентный состав из натрия хлорида, желатина и трегалозы — вариант 5. В процентном соотношении защитное действие протекторов в течение экспериментального срока хранения выражалось в следующих показателях: 38, 44, 100% — варианты 3, 4 и 5 соответственно.

Заключение

Таким образом в результате проведенных экспериментов было определено, что компонентный состав, содержащий натрия хлорид, желатин и трегалозу, обладает максимальным защитным действием для МИ ИВД «Сыворотка диагностическая холерная не O1 группы O139 адсорбированная кроличья для реакции агглютинации на стекле» при его лиофилизации. Указанная протективная среда может быть рекомендована для производства сыворотки холерной не O1 группы O139 в целях снижения/минимизации рисков при проведении критического технологического этапа — сублимационного высушивания и при последующем долгосрочном хранении.

Литература

1. Блынская Е.В., Тишков С.В., Алексеев К.В., Марахова А.И. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации пептидов и белков // Фармация. — 2017. — № 66(1). — С. 14–18.
2. Дмитриева М.В., Лугэнь Бу, Полозкова А.П., Орлова О.А., Краснюк И.И., Краснюк И.И. (мл.). Выбор криопротектора для получения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы производного индокарбазола ЛХС 1269 // Российский биотерапевтический журнал. — 2021. — № 20(1). — С. 74–79.
3. Комиссаров А.В., Кочкалова Н.Н., Сеницына Н.В., Бадарин С.А., Костылева Н.И., Волох О.А., Клокова О.Д., Никифоров А.К. Исследование процесса сублимационного высушивания иммуногенов холерной химической вакцины // Проблемы особо опасных инфекций. — 2016. — № 1. — С. 90–93.
4. Охупкина В.Ю. Методы поддержания микробных культур. Часть 2. Лиофилизация // Теоретическая и прикладная экология. — 2009. — № 4. — С. 21–32.
5. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Демушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. — 2009. — № 4(12). — С. 99–121.

References

1. Blynskaya YeV, Tishkov SV, Alekseyev KV, Marakhova AI. Vspomogatel'nyye veshchestva v tekhnologii liofilizatsii peptidov i belkov. Farmatsiya 2017; 66(1):14–18 (in Russian).

2. Dmitriyeva MV, Lugen' Bu, Polozkova AP, Orlova OL, Krasnyuk II, Krasnyuk II (ml). Vybor krioprotektora dlya polucheniya liofilizirovannoy liposomal'noy lekarstvennoy formy proizvodnogo indolokarbazola LKHS 1269. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal 2021; 20(1):74–79 (in Russian).
3. Komissarov AV, Kochkalova NN, Sinitsyna NV, Badarin SA, Kostyleva NI, Volokh OA, Klokovala OD, Nikiforov AK. Issledovaniye protsessa sublimatsionnogo vysushivaniya immunogenov kholernoy khimicheskoy vaksiny. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2016; 1:90–93 (in Russian).
4. Okhapkina VYu. Metody podderzhaniya mikrobnym kul'tur. Chast' 2. Liofilizatsiya. Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya 2009; 4:21–32 (in Russian).
5. Pokhilenko VD, Baranov AM, Detushev KV. Metody dlitel'nogo khraneniya kolleksiionnykh kul'tur mikroorganizmov i tendentsii razvitiya. Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Meditsinskiye nauki 2009; 4(12):99–121 (in Russian).

ASSESSMENT OF THE INFLUENCE OF THE COMPONENT COMPOSITION OF CRYOPROTECTORS ON THE STABILITY OF ANALYTICAL INDICATORS WITH LYOPHILIZATION OF A MEDICAL DEVICE FOR DIAGNOSTICS *IN VITRO* «DIAGNOSTIC *CHOLERA SERUM* OF NON-O1 GROUP O139 ADSORBED IN RABBIT FOR REACTION AGGLUTINATION ON GLASS»

M.V. OVCHINNIKOVA, A.S. FESKOVA, I.V. SHULGINA, O.A. LOBOVIKOVA,
L.V. ZAITSEVA, T.Yu. KIRILLOVA, A.V. COMISSAROV, A.K. NIKIFOROV

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

The work examines the possibility of using various options for cryoprotectors in the production of a medical product for *in vitro* diagnostics «Diagnostic *Cholera serum* non-O1 group O139, adsorbed, rabbit for slide agglutination test» in order to reduce the risks during freeze-drying of the drug and its subsequent long-term storage. The specified protective medium can be recommended for the production of non-O1 group O139 *Cholera serum* in order to reduce/minimize risks. Taking into account long-term experience, drying media containing different combinations of such protective components as peptone, sodium chloride, gelatin, sucrose and trehalose. We used a special diagnostic serum. The lyophilization process was carried out under standard conditions. Tested modes are also implemented freezing and drying.

Keywords: protective media, diagnostic sera, lyophilization, analytical sensitivity, specificity.

Address:

Feskova A.S.
Researcher, department of standardization, quality and metrology,
Russian Anti-Plague Institute «Microbe» of Rospotrebnadzor
E-mail: Feskovaas@yandex.ru

Для цитирования:

Овчинникова М.В., Феськова А.С., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Зайцева Л.В., Кириллова Т.Ю., Комиссаров А.В., Никифоров А.К. Оценка влияния компонентного состава криопротекторов на стабильность аналитических показателей при лиофилизации медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Сыворотка диагностическая холерная не O1 группы O139 адсорбированная кроличья для реакции агглютинации на стекле». Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2024; 20(1):61–67.

For citation:

Ovchinnikova M.V., Feskova A.S., Shulgina I.V., Lobovikova O.A., Zaitseva L.V., Kirillova T.Yu., Comissarov A.V., Nikiforov A.K. Assessment of the influence of the component composition of cryoprotectors on the stability of analytical indicators with lyophilization of a medical device for diagnostics *in vitro* «Diagnostic *Cholera serum* of non-O1 group O139 adsorbed in rabbit for reaction agglutination on glass». Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(1):61–67 (in Russian).

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА БИОКОРРОЗИОННОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВОГРУНТА НА ТРАССАХ НЕФТЕПРОВОДА С УЧЁТОМ АНАЛИЗА БИОПЛЁНКИ МИКОБИОТЫ

М.Г. ЧЕСНОКОВА^{1,2*}, В.В. ШАЛАЙ¹, А.Ю. МИРОНОВ^{3,4}

¹ Омский государственный технический университет,

² Омский государственный медицинский университет Минздрава, Омск;

³ Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора,

⁴ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи
и медицинских технологий ФМБА, Москва

Бактериальные популяции, формирующиеся в почвенном биоценозе, образуют биоплёнки, являющиеся оптимальной формой существования микроорганизмов в природе с благоприятными условиями для роста и развития. Представляет несомненный интерес вопрос комплексного взаимодействия почвенной коррозионно-активной микробиоты вблизи нефтепровода и аборигенных микромицетов. Цель исследования состояла в проведении комплексной оценки биокоррозионной активности почвогрунта на трассах нефтепровода с учётом анализа биоплёнки. Определена биокоррозионная активность почвогрунта вблизи нефтепровода в соответствии с установленным критерием, отмечено присутствие агрессивных, умеренно-агрессивных, слабоагрессивных, потенциально агрессивных образцов почвогрунта. Проведена идентификация тионовых и сульфатредуцирующих бактерий, микромицетов. С помощью сканирующей электронной микроскопии изучены биоплёнки микромицетов на поверхности образца стали. Полученные результаты указывают на важное значение проведения комплексной оценки биокоррозионной активности почвогрунта на трассах нефтепровода, включающей в себя микробиологическое исследование коррозионно-активных представителей микробиоты почвенного биоценоза с учётом анализа биоплёнки микробиоты.

Ключевые слова: биокоррозия, почвогрунт, нефтепровод, микромицеты, биоплёнка.

Введение

Важным фактором развития биокоррозии являются процессы жизнедеятельности в окружающей среде и на поверхности металлов микроорганизмов, что способствует биодеградации антропогенных материалов, снижению их долговечности, сокращению срока эксплуатации сооружений и конструкций [1, 2, 11]. Бактерии цикла серы, преимущественно тионовые и сульфатредуцирующие бактерии, ускоряют подземную коррозию трубопроводов [4, 12]. Выход из строя нефтепроводов и

газопроводов обусловлен деятельностью сульфатвосстанавливающих и тионовых бактерий. Формируются популяции бактерий, образующих биоплёнки, являющиеся оптимальной формой существования микроорганизмов в природе с благоприятными условиями для роста и развития [3, 8].

При проведении оценки биокоррозионной активности почвогрунта подземных трубопроводов следует учитывать выраженность фактора почвенной микробиоты экосистемы и микологический фактор, определяющий выявление доминирующих представителей микромицетов почвогрунта нефтепровода [10, 13]. Вместе с тем многие микромицеты способны к деструкции токсикантов, в том числе углеводов, особенно в ассоциациях с бактериями [7, 9]. Ряд видов грибов вовлекается в процессы деструкции углеводов и способен использовать углеводороды нефти в качестве источника питания: данный процесс является естественным для большинства типов нефтезагрязнённых почв [5, 6]. Вот почему для нас представлял несомненный интерес вопрос взаимодействия почвенной коррозионно-активной

© 2024 г. Чеснокова М.Г., Шалай В.В., Миронов А.Ю.

* Автор для переписки:

Чеснокова Марина Геннадьевна

д.м.н., профессор, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России «Омский государственный медицинский университет»; профессор, кафедра биотехнологии, технологии общественного питания и товароведения ФГАОУ ВО ОмГТУ «Омский государственный технический университет»

E-mail: chesnokova_marin@mail.ru

микробиоты и комплекса аборигенных микромицетов, анализ микологической биоплёнки на поверхности стали и микромицетов почвогрунта.

Цель исследования — проведение комплексной оценки биокоррозионной активности почвогрунта на трассах нефтепровода с учётом анализа биоплёнки.

Материалы и методы

Определяли критерий биокоррозионной активности почвогрунта подземного трубопровода (КБА), представляющий суммарный эффект действия различных факторов коррозии (количественное содержание тионовых и сульфатредуцирующих бактерий, общая концентрация серы, железа, величина удельного электросопротивления). Проводили микологическое исследование с выделением чистой культуры грибов-микромицетов и их последующей идентификацией. Количественное содержание микроорганизмов выражали через величину выросших колоний в 1 грамме почвогрунта (КОЕ/г). Биометрический анализ проведён с использованием пакетов Statistica-6, Биостатистика, возможностей программы Microsoft Excel.

В экспериментальной части работы чистые культуры грибов-микромицетов, выделенные из агрессивных проб почвогрунта, инкубировали с образцами стали в питательной среде с последующей фиксацией. Сформированную биоплёнку на поверхности образцов стали исследовали с помощью растрового электронного микроскопа JEOL JCM-5700 с энергодисперсионным спектрометром для качественного и количественного элементного анализа.

Результаты

Анализ биокоррозионной активности почвогрунта показал присутствие агрессивных, умеренно-агрессивных, слабоагрессивных, потенциально агрессивных образцов почвогрунта. Агрессивные пробы определяли в 5,73% случаев, умеренно-агрессивные — в 35,67%, слабоагрессивные — 41,4% и потенциально агрессивные — 17,2% случаев, при критерии биокоррозионной активности грунта, соответственно, $8,1 \pm 0,12$, $5,34 \pm 0,3$, $3,25 \pm 0,21$, $1,37 \pm 0,5$. Бактериологический количественный анализ образцов почвогрунта установил идентификацию тионовых и сульфатредуцирующих бактерий. Тионовые бактерии присутствовали при содержании $2,23 \times 10^5$ КОЕ/г, сульфатредуцирующие бактерии

идентифицировали в концентрации $3,5 \times 10^4$ КОЕ/г в 1 грамме почвы.

Культуры микромицетов выделяли из агрессивных проб почвогрунта. При проведении микологического исследования образцов почвогрунта установлено присутствие микромицетов, принадлежащих преимущественно к родам *Penicillium* spp. и *Aspergillus* spp. в средней концентрации, соответственно, $4,32 \times 10^4$ КОЕ/г и $3,16 \times 10^4$ КОЕ/г в 1 грамме почвы.

Микрофотографии биоплёнки микромицетов рода *Penicillium* на поверхности образцов стали, полученные при проведении сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) представлены на рисунках 1 и 2.

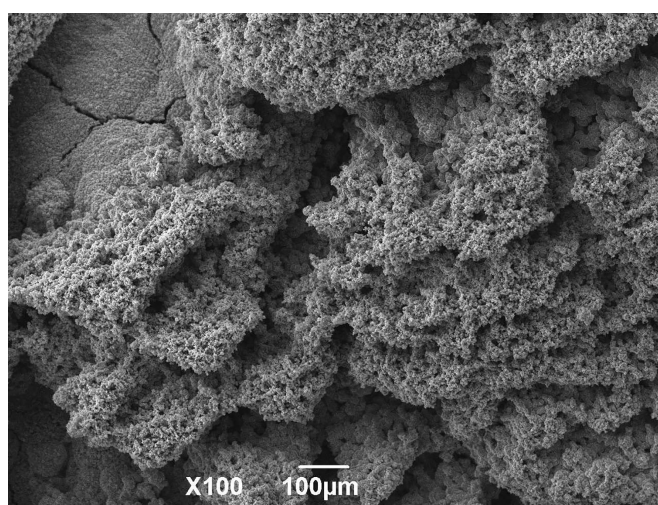


Рис. 1. Развитие биоплёнки микромицетов на поверхности образца стали (СЭМ)

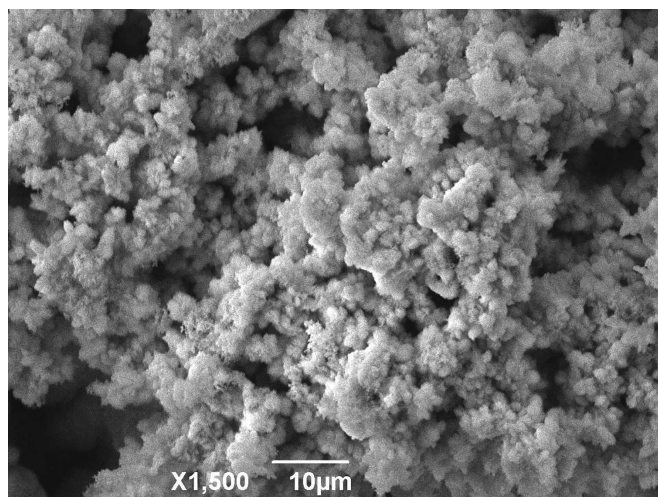


Рис. 2. Микрофотография биоплёнки микромицетов на поверхности опытного образца стали (СЭМ).

Видны участки сформированной биоплёнки гриба и микротрещины на поверхности образцов. Отмечается мощная и развитая поверхность биоплёнки,

имеются различные по величине впадины и возвышения. На микрофотографиях наглядно представлен своеобразный и многоярусный характер формирования биоплёнки грибов, которая плотными прерывистыми слоями различной высоты покрывает поверхность образцов.

Обсуждение

Развитие биокоррозии нефтепровода обусловлено жизнедеятельностью в окружающей среде и на поверхности металлов биоплёнки микроорганизмов, вызывающих биодеградацию антропогенных материалов, снижение их долговечности, сокращение срока эксплуатации нефтепровода. Выход из строя нефтепроводов обусловлен жизнедеятельностью сульфатвосстанавливающих и тионовых бактерий. Проведённый анализ биокоррозионной активности почвогрунта вблизи нефтепровода показал, что в соответствии с установленным критерием присутствовали агрессивные, умеренно-агрессивные, слабоагрессивные, потенциально агрессивные образцы почвогрунта. Среди исследованных образцов преобладают пробы почвогрунта, характеризующиеся критериями слабой агрессивности и агрессивности. Бактериологический количественный анализ образцов почвогрунта выявил и идентифицировал тионовые и сульфатредуцирующие бактерии в различной концентрации.

В большинстве типов нефтезагрязнённых почв происходит процесс деструкции углеводов нефти рядом видов грибов, которые способны использовать углеводороды нефти в качестве источника питания. Нами выявлены доминирующие представители микробиоты почвогрунта нефтепровода, которые принадлежат к родам *Penicillium* и *Aspergillus*, и определена их количественная характеристика. При изучении биоплёнки микробиоты на поверхности образца стали с помощью СЭМ получены микрофотографии, свидетельствующие о мощной и развитой поверхности биоплёнки с имеющимися неоднородными по величине впадинами и возвышениями. Установлен своеобразный и многоярусный характер формирования грибной биоплёнки.

Заключение

Осуществлённые исследования показывают актуальность проведения комплексной оценки биокоррозионной активности почвогрунта на трассах нефтепровода,

включающей в себя микробиологическое исследование коррозионно-активных представителей микробиоты почвенного биоценоза с учётом анализа биоплёнки микробиоты.

Представляет практический интерес микологический учёт содержания микромицетов почвогрунтов помимо оценки количественного состава бактерий цикла серы. Применение СЭМ позволяет получить изображения биоплёнки грибов, развивающейся на поверхности образцов из стали и оценить её морфологический характер. Дальнейшее изучение этапов формирования микологической биоплёнки почвенных микромицетов даст возможность установить спектр взаимоотношений в поликомпонентной микробной популяции, расширить представление об особенностях механизма их взаимодействия с бактериальной почвенной микробиотой, обладающей выраженной коррозионной агрессивностью по отношению к подземным металлоконструкциям, и разработать мероприятия, предотвращающие биокоррозию нефтепровода.

Литература

1. Зайцева О.В., Клёнова Н.А. Микробиологическая коррозия нефтегазовых трубопроводов и легирование стали для борьбы с ней // Нефтяное хозяйство. — 2008. — № 4. — С. 92–95.
2. Харисов Р.А., Хабирова Ф.Р., Мустафин Ф.М. Основные причины возникновения дефектов изоляционных покрытий // Нефтегазовое дело. — 2005. — № 4. — С. 10–18.
3. Чеснокова М.Г., Шалай В.В., Краус Ю.А., Миронов А.Ю., Блинова Е.Г. Информативность показателя биокоррозионной активности для выявления характера агрессивности грунта // Гигиена и санитария. — 2016. — Т. 95. — № 6. — С. 513–517.
4. Чеснокова М.Г., Шалай В.В., Краус Ю.А., Миронов А.Ю. Биокоррозионная активность почвогрунта на трассах нефтепровода Краснодарского края // Нефтяное хозяйство. — 2016. — № 5. — С. 102–105.
5. Chesnokova M.G., Shalai V.V., Mironov A.Yu., Rogachev E.A. Aspects of studying the mycobiota biofilm of the oil pipeline soil ecosystem during scanning electron microscopy // Oil and Gas Engineering, Omsk, 16–19 february 2021. — Melville: AIP PUBLISHING, 2023. — Vol. 2784. — Issue 1. — P. 050004. doi: 10.1063/5.0140459.
6. Chesnokova M.G., Shalai V.V., Mulkeev E.N., Polonyankin D.A., Mironov A.Yu. Application of scanning electron microscopy of biofilm in testing corrosion activity at the petrochemical enterprise AO «Omsky Kauchuk» // Oil and Gas Engineering, Omsk, 16–19 february 2021. — Melville:

- AIP PUBLISHING, 2023. – Vol. 2784. – Issue 1. – P. 070004. doi: 10.1063/5.0140463.
7. Chesnokova M.G., Shalay V.V., Kraus Yu.A., Cherkashina N.V., Mironov A.Yu. Analysis of corrosion defects on oil pipeline surface using scanning electron microscopy and soil thionic and sulfate-reducing bacteria quantification // *Procedia engineering*. – 2016. – Vol. 152. – P. 247–250.
 8. Chesnokova M.G., Shalay V.V. An actuality of soil micromyceta community studies for soil biocorrosive activity evaluation on the oil pipeline routes // *AIP Conference Proceedings*, Omsk, 26 february – 02 march 2018. – Omsk, 2018. – P. 020006. doi: 10.1063/1.5051845.
 9. Hausler R.H., Martin T.G. Development of a corrosion inhibition model for oil and gas production based on laboratory and field measurements // 9th European symposium on corrosion inhibitors. Ferrara. – 2000. – Vol. 1. – No. 1. – P. 941–975.
 10. Kato S., Yumoto I., Kamagata Y. Isolation of acetogenic bacteria that induce biocorrosion by utilizing metallic iron as the sole electron donor // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2015. – Vol. 81. – No. 1. – P. 67–73.
 11. Liang R., Grizzle R.S., Duncan K.E. et al. Roles of thermophilic thiosulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea in the biocorrosion of oil pipelines // *Front. Microbiol. Sec. Microbial Physiology and Metabolism*. – 2014. – Vol. 5. – Art. 89. doi: 10.3389/fmicb.2014.00089.
 12. Little B.J., Lee J.S., Ray R.I. Diagnosing microbiologically influenced corrosion. A State-of-the-Art Review // *Corrosion*. – 2006. – Vol. 62. – Issue 11. – P. 1006–1017.
 13. van Tilburg Bernardes E., Lewenza S., Reckseidler-Zenteno S. Current research approaches to target biofilm infections // *J. Postdoc. Res.* – 2015. – Vol. 3. – No. 6. – P. 36–49.
 1. Zaytseva OV, Klonova NA. Mikrobiologicheskaya korroziya neftegazovykh truboprovodov i legirovaniye stali dlya bor'by s ney. *Neftyanoye khozyaystvo* 2008; 4:92–95 (in Russian).
 2. Kharisov RA, Khabirova FR, Mustafin FM. Osnovnyye prichiny vozniknoveniya defektov izolyatsionnykh pokrytiy. *Neftegazovoye delo* 2005; 4:10–18 (in Russian).
 3. Chesnokova MG, Shalay VV, Kraus YUA, Mironov AYU, Blinova YeG. Informativnost' pokazatelya biokorroziyonnoy aktivnosti dlya vyyavleniya kharaktera aggressivnosti grunta. *Gigiyena i sanitariya* 2016; 95(6):513–517 (in Russian).
 4. Chesnokova MG, Shalay VV, Kraus YuA, Mironov AYu. Biokorroziyonnaya aktivnost' pochvogrunta na trassakh nefteprovoda Krasnodarskogo kraya. *Neftyanoye khozyaystvo* 2016; 5:102–105 (in Russian).
 5. Chesnokova MG, Shalay VV, Mironov AYu, Rogachev EA. Aspects of studying the mycobiota biofilm of the oil pipeline soil ecosystem during scanning electron microscopy. *Oil and Gas Engineering*, Omsk, 16–19 february 2021. Melville: AIP PUBLISHING, 2023; 2784(1):050004. doi: 10.1063/5.0140459.
 6. Chesnokova MG, Shalay VV, Mulkeev EN, Polonyankin DA, Mironov AYu. Application of scanning electron microscopy of biofilm in testing corrosion activity at the petrochemical enterprise AO «Omsky Kauchuk». *Oil and Gas Engineering*, Omsk, 16–19 february 2021. Melville: AIP PUBLISHING, 2023; 2784(1):070004. doi: 10.1063/5.0140463.
 7. Chesnokova MG, Shalay VV, Kraus YuA, Cherkashina NV, Mironov AYu. Analysis of corrosion defects on oil pipeline surface using scanning electron microscopy and soil thionic and sulfate-reducing bacteria quantification. *Procedia engineering* 2016; 152:247–250.
 8. Chesnokova MG, Shalay VV. An actuality of soil micromyceta community studies for soil biocorrosive activity evaluation on the oil pipeline routes. *AIP Conference Proceedings*, Omsk, 26 february – 02 march 2018. Omsk, 2018: 020006. doi: 10.1063/1.5051845.
 9. Hausler RH, Martin TG. Development of a corrosion inhibition model for oil and gas production based on laboratory and field measurements. 9th European symposium on corrosion inhibitors. Ferrara 2000; 1(1):941–975.
 10. Kato S, Yumoto I, Kamagata Y. Isolation of acetogenic bacteria that induce biocorrosion by utilizing metallic iron as the sole electron donor. *Applied and Environmental Microbiology* 2015; 81(1):67–73.
 11. Liang R, Grizzle RS, Duncan KE et al. Roles of thermophilic thiosulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea in the biocorrosion of oil pipelines. *Front Microbiol Sec Microbial Physiology and Metabolism* 2014; 5:89. doi: 10.3389/fmicb.2014.00089.
 12. Little BJ, Lee JS, Ray RI. Diagnosing microbiologically influenced corrosion. A State-of-the-Art Review. *Corrosion* 2006; 62(11):1006–1017.
 13. van Tilburg Bernardes E, Lewenza S, Reckseidler-Zenteno S. Current research approaches to target biofilm infections. *J Postdoc Res* 2015; 3(6):36–49.

COMPREHENSIVE ASSESSMENT OF BIOCORROSIVE ACTIVITY OF SOIL ON OIL PIPELINE ROUTES TAKEN INTO ACCOUNT OF ANALYSIS OF MYCOBIOTA BIOFILM

M.G. CHESNOKOVA^{1,2}, V.V. SHALAY¹, A.Yu. MIRONOV^{3,4}

¹ *Omsk State Technical University,*

² *Omsk State Medical University of the Ministry of Health, Omsk;*

³ *Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after G.N. Gabrichevsky Rospotrebnadzor,*

⁴ *Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies FMBA, Moscow*

Bacterial populations that form in the soil biocenosis form biofilms, which are the optimal form of existence of microorganisms in nature with favorable conditions for growth and development. The question of interaction between soil corrosive microbiota near an oil pipeline and a complex of native micromycetes is of undoubted interest. The purpose of the study is to conduct a comprehensive assessment of the biocorrosive activity of soil along oil pipeline routes, taking into account the analysis of biofilm. The biocorrosive activity of the soil near the oil pipeline was determined in accordance with the established criterion; the presence of aggressive, moderately aggressive, slightly aggressive, and potentially aggressive soil samples was noted. Thionic and sulfate-reducing bacteria and micromycetes were identified. Biofilms of micromycetes on the surface of a steel sample were studied using scanning electron microscopy. The results obtained show the relevance of a comprehensive assessment of the biocorrosive activity of soil along oil pipeline routes, including a microbiological study of corrosive representatives of the microbiota of the soil biocenosis, taking into account the analysis of the mycobiota biofilm.

Keywords: biocorrosion, soil, oil pipeline, micromycetes, biofilm.

Address:

Chesnokova M.G., Ph.D.

Professor, department of microbiology, virology and immunology,
Omsk State Medical University of the Ministry of Health of Russia;

Professor, department of biotechnology, catering technology
and commodity science, Federal State Autonomous Educational
Institution of Higher Education Omsk State Technical University

«Omsk State Technical University»

E-mail: chesnokova_marin@mail.ru

Для цитирования:

Чеснокова М.Г., Шалай В.В., Миронов А.Ю. Комплексная оценка биокоррозионной активности почвогрунта на трассах нефтепровода с учётом анализа биоплёнки микобиоты. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2024; 20(1):68–72.

For citation:

Chesnokova M.G., Shalay V.V., Mironov A.Yu. Comprehensive assessment of biocorrosive activity of soil on oil pipeline routes taken into account of analysis of mycobiota biofilm. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(1):68–72 (in Russian).

МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ ПИРОГЕННОСТИ ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

М.В. БУЛАТОВА*, А.Б. РЫЖИКОВ, С.В. УСОВА, М.П. БОГРЯНЦЕВА

*ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
р.п. Кольцово, Новосибирская область*

Проведен обзор работ по проблеме пирогенности для оценки качества лекарственных средств. Осуществлено сравнение трех тестов, применяемых при контроле пирогенности. Первый метод для определения всех пирогенов, включая эндотоксины, предполагает использование животных — кроликов. Второй метод, занимающий доминирующее значение во всем мире, — это высокочувствительный и специфичный ЛАЛ-тест, позволяющий определять бактериальные эндотоксины. Третий метод — тест активации моноцитов (МАТ), который дает возможность определять как бактериальные эндотоксины, так и пирогены неэндотоксиновой природы. Тест активации моноцитов более чувствителен, чем метод определения пирогенности на кроликах — при широкой специфичности предел обнаружения МАТ составляет 0,04 ЕЭ/мл, но он примерно в десять раз менее чувствителен по сравнению с ЛАЛ-тестом. Возможно, МАТ является золотой серединой среди представленных трех методов.

Ключевые слова: пирогенность, контроль, методы, тест на кроликах, ЛАЛ-тест, тест активации моноцитов, обзоры.

Введение

С появлением инъекционных лекарственных препаратов (ЛП) было установлено такое явление, как «инъекционный жар»: развитие у пациента лихорадки в ответ на инъекцию лекарства. В 1911 г. В. Вексельман показал, что причина «инъекционного жара» — бактерии, которые находятся в воде, используемой для приготовления инъекционных растворов. В том же году Е.К. Хорт и В.Дж. Пенфолд доказали, что раствор может быть стерильным, но при этом вызывать пирогенную реакцию [23].

Термин «пироген» был заимствован из греческого языка и введён в употребление венским хирургом Христианом Теодором Бильротом в 1862 году. Явление повышения температуры связано со словом «Пир» (Pyr) и «Ген» (Genos), что в переводе означает «огонь» и «рождающий, вызывающий», соответственно [30]. К пирогенам можно отнести: грамотрицательные бактерии и их токсины, грамположительные бактерии и их токсины, вирусы и продукты их жизнедеятельности, а также

стероиды, синтетические адъюванты и др. Несмотря на то, что список пирогенов довольно обширен, в области контроля качества инъекционных лекарственных средств (ЛС) практическое значение имеют главным образом пирогены, вырабатываемые грамотрицательными бактериями — бактериальные эндотоксины (БЭ) [11]. Термин «эндотоксины» предполагает внутреннее происхождение этих токсинов в отличие от «экзотоксинов» — токсинов, выделяемых бактериями в процессе жизнедеятельности в окружающую среду [8].

Впервые официальные биологические методы контроля качества ЛС были введены в Государственную фармакопею (ГФ) СССР в IX издании 1961 года [3]. За период, истекший со времени выхода в свет VIII издания Фармакопеи, фармацевтическая наука, медицинская промышленность и аптечное дело получили широкое развитие. Было создано много новых лекарственных средств, изучено большое число новых лекарственных растений, нашедших применение в медицинской практике.

В области контроля качества биофармацевтических препаратов практическое значение имеют определение и уровень содержания бактериальных эндотоксинов [18], которые представляют собой часть внешней клеточной мембраны всех грамотрицательных бактерий [29]. Бактериальные эндотоксины, или липополисахариды (ЛПС) [20], являются одними из основных примесей готовых лекарственных инъекционных форм (ГЛФ) и активных фармацевтических субстанций (АФС). Присутствие

© 2024 г. Булатова М.В., Рыжиков А.Б., Усова С.В., Богрянцева М.П.

* **Автор для переписки:**

Булатова Мария Владимировна
аспирант, технолог 2 категории отдела биологического и технологического контроля ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
E-mail: mari.bulatova.90@mail.ru

их в ГЛФ и АФС оказывает существенное воздействие на организм человека, вызывая аллергические и воспалительные реакции, повреждение тканей и даже может приводить к серьезным нарушениям биохимических процессов, вплоть до летального исхода в случае высоких концентраций.

Высокая стабильность эндотоксинов, их высокая биологическая активность, большая вероятность их присутствия в ЛС из-за возможного попадания с сырьем, водой, из бактериальных клеток-продуцентов, либо из воздуха, а также те серьезные последствия, которые вызываются попаданием эндотоксинов в организм, делают необходимым обязательный контроль присутствия эндотоксинов в ГЛФ и АФС, предназначенных для их производства.

Согласно требованиям международного и отечественного стандартов, содержащих своды правил безопасного и качественного изготовления лекарственных средств [2], количество пирогенных примесей в инъекционных лекарственных препаратах должно быть сведено к минимуму. Необходимый контроль за уровнем этих примесей может быть осуществлен с помощью трех методов.

Первый метод для определения всех пирогенов, включая эндотоксины, предполагает использование животных — кроликов [38]. Второй метод, занимающий доминирующее значение во всем мире, — это высокочувствительный и специфичный ЛАЛ-тест, созданный для определения содержания БЭ *in vitro* и позволяющий определять бактериальные эндотоксины, которые в редких случаях могут не являться пирогенами [21]. Третий метод — тест активации моноцитов (МАТ), который позволяет определять как бактериальные эндотоксины, так и пирогены неэндотоксиновой природы [35].

Тест на пирогенность

При разработке теста на пирогенность в качестве тест-объектов для испытаний были исследованы многие виды животных. Уровень чувствительности к пирогенам и характер развития пирогенной реакции позволили выбрать два вида: собаки и кролики. У кроликов механизм терморегуляции более гибкий, и они могут давать ложноположительные результаты. Таким образом, в случае кроликов отрицательный результат — отсутствие пирогенов более надежен, чем положительный. У собак же более стабильная терморегуляция, но они менее чувствительны к пирогенам, чем кролики. Зато положительная реакция у собак более четкая, с ярко выраженными побочными явлениями. Это означает, что

положительный результат для собак более надежен, чем отрицательный. Таким образом, кролики оказались более подходящими животными для теста, указывающего на отсутствие пирогенов; собаки же лучше подходят для теста, указывающего на наличие пирогенов. Однако из-за порой агрессивного поведения собак предпочтение было отдано кроликам [37].

При дальнейшем изучении данного теста на кроликах была определена минимальная пирогенная доза для пирогенов различной природы, что позволило подбирать тест-дозы испытуемых ЛС таким образом, чтобы они обеспечивали отсутствие пирогенной реакции у пациентов при клиническом применении [9].

Биологический метод испытания ЛС на пирогенность предусмотрен фармакопеями всех стран и основан на измерении температуры тела кроликов до и после введения им испытуемых лекарственных средств [5, 16, 19]. Повышение температуры выше допустимой нормы указывает на наличие во вводимом препарате пирогенных примесей.

Необходимо отметить, что для получения достоверных результатов теста на пирогенность имеет важное значение поддержание условий кормления и содержания животных, соответствующих требованиям [5].

Основным недостатком метода *in vivo* является использование в эксперименте животных, чувствительность которых к пирогенам в 3–4 раза ниже, чем у человека. Кроме того, многие лекарственные вещества в дозах, близких к терапевтическим, могут вызвать токсические реакции и даже гибель животных. К недостаткам метода также можно отнести относительную длительность (4–5 часов) опыта, отсутствие четких количественных характеристик полученных результатов, значительную вариабельность результатов, связанную с индивидуальной чувствительностью животных и сезонностью [28]. Кроме того, многие препараты (средства для наркоза, седативные препараты, миорелаксанты, радиоактивные препараты, препараты, маскирующие пирогенный эффект или, напротив, вызывающие его, и т.д.) невозможно испытывать на животных из-за их фармакологического действия или физико-химических свойств (нерастворимость в водных растворителях, вязкость и др.).

Однако у биологического метода испытания на пирогенность имеются неоспоримые преимущества. Так, использование млекопитающих, то есть вида, близкого к человеку, позволяет установить влияние испытуемого лекарственного препарата на организм в целом. С помощью испытания на животных возможно определять действие обоих классов пирогенов — экзотоксинов и

эндотоксинов, — а также пирогенов небактериальной природы, в то время как, применяя однонаправленный метод контроля ЛАЛ-тест, можно обнаружить только БЭ [10].

ЛАЛ-тест

Началом разработки ЛАЛ-теста можно считать совместные работы Дж. Левина и Ф.Б. Банга в 1960-х годах, которые установили способность амебоцитов мечехвоста образовывать плотный гелевый сгусток при взаимодействии с БЭ, что было положено в основу нового теста [27]. К началу 1970-х годов были отработаны методы получения лизата амебоцитов и способы проведения теста для обнаружения БЭ. С конца 1970-х годов началось промышленное производство ЛАЛ-реактивов. В 1983 году ЛАЛ-тест введен в USP XX издания как альтернативный тесту «Пирогенность» [31]. Дальнейшее развитие ЛАЛ-теста привело к расширению его возможностей и появлению к 1991 г. дополнительных кинетических методов (колориметрического и турбидиметрического) [11]. В России до начала XXI века показатель БЭ присутствовал в основном в нормативных документах (НД) на зарубежные препараты. Для отечественных производителей проведение анализа с помощью ЛАЛ-теста стало возможным после введения временной фармакопейной статьи «Определение содержания бактериальных эндотоксинов, ЛАЛ-тест» (ВФС 42-2960–97) в 1997 г. В 2000 г. она была заменена общей фармакопейной статьёй «Бактериальные эндотоксины» (ОФС 42-0002–00), а с начала 2001 г. приступили к активному включению ЛАЛ-теста в ФСП отечественными производителями. В 2007 г. тест «Бактериальные эндотоксины» впервые включен в ГФ РФ XII изд., которая имела особое значение в гармонизации отечественных биологических методов с требованиями Европейского Союза [10].

В то же время стало понятно, что ЛАЛ-тест не может быть альтернативным тесту «Пирогенность» из-за различной чувствительности и специфичности методов, так как они являются однонаправленными.

В основе этого теста лежит способность лизата амебоцитов (клеток крови) мечехвоста специфически реагировать с эндотоксинами грамотрицательных бактерий. В результате реакции эндотоксина и лизата происходят помутнение прозрачной реакционной смеси или образование твердого геля, что и служит индикатором присутствия эндотоксина. Кровь, точнее гемолимфа, мечехвостов имеет голубую окраску, которую ей придает пигмент гемоцианин, выполняющий

кислородтранспортную функцию. В крови содержится только один тип клеток — амебоциты или гранулярные гемоциты. Свертывание крови происходит в два этапа: первый — слипание, или агглютинация, клеток; второй — гелирование гемолимфы. На первом этапе происходят разрушение клеток и высвобождение в плазму различных компонентов коагуляционной системы — способного свертываться белка (коагулогена) и ферментов. После этого происходит свертывание крови, в результате чего образуется гель. В отсутствие эндотоксинов коагуляции не происходит [7].

Существуют три основных методологических подхода для проведения данного испытания:

- гель-тромб метод, наиболее широко используемый и основанный на образовании геля. ЛАЛ-тест проводят в асептических условиях, смешивая в пробирке 0,1 мл испытуемого раствора с 0,1 мл лизата. Смесь инкубируют при 37 °С в течение от 15 до 90 мин при рН от 6,0 до 8,0, не подвергая ее встряхиванию. При наличии пирогенных эндотоксинов грамотрицательных бактерий образуется гель, который обнаруживается по увеличению вязкости смеси, потере ею текучести. При повороте пробирки на 180° гель остается в первоначальном положении;

- турбидиметрический метод, основанный на помутнении реакционной смеси после расщепления субстрата, содержащегося в лизате амебоцитов, то есть изменяется его оптическая плотность, причем скорость изменения данного параметра напрямую зависит от количественного содержания БЭ. Как правило, критерием оценки является достижение заранее определенного порогового значения оптической плотности. Среди всех вариаций ЛАЛ-теста данный метод является наиболее чувствительным (максимальная чувствительность 0,001 ЕЭ/мл). Выполнение анализа требует наличия термостатирующего инкубатора с фотометром, позволяющего проводить непрерывное измерение оптической плотности реакционной смеси при инкубации в условиях заданной температуры;

- хромогенный метод, основанный на появлении окрашивания после расщепления синтетического пептид-хромогенного комплекса. При наличии ЛПС исследуемые растворы окрашиваются в желтый цвет, причем интенсивность цвета пропорциональна содержанию БЭ, что позволяет построить градуировочную кривую и использовать данный метод для количественного анализа содержания БЭ. Максимальная чувствительность метода составляет 0,005 ЕЭ/мл. ЛАЛ-реактив для выполнения хромогенного теста значительно отличается от реактивов, предназначенных для проведения гель-тромб теста и турбидиметрического теста. В этом реактиве естествен-

ный субстрат — коагулоген заменен на искусственный хромогенный субстрат. Неоспоримым достоинством хромогенного ЛАЛ-теста является возможность точного определения содержания БЭ и значительно более высокая воспроизводимость метода [4, 26].

К преимуществам ЛАЛ-теста относятся:

- Чувствительность метода к бактериальным эндотоксинам превышает чувствительность кроликов в 10–15 раз. Такая чувствительность достаточна для гарантированного определения содержания бактериальных эндотоксинов в инфузионных растворах, где предельная концентрация БЭ должна быть наиболее низкой.

- Возможность количественной оценки содержания бактериальных эндотоксинов. Использование гель-тромб теста позволяет выяснить, насколько это содержание меньше установленной величины. Возможность количественного определения содержания бактериальных эндотоксинов оказывается очень полезной при организации постадийного контроля производства.

- Быстрота получения результатов. Результаты анализа могут быть получены за 1,5–2 часа.

- Дешевизна метода по сравнению с анализом на кроликах.

- Возможность определения бактериальных эндотоксинов в лекарственных препаратах, которые нельзя испытывать на кроликах (препараты седативного действия, короткоживущие изотопы).

Недостатками метода являются: а) недостаточная специфичность при анализе содержания БЭ в таких многокомпонентных растворах, как кровь и плазма, и б) необходимость наличия специального оборудования, что затрудняет его использование в качестве экспресс-метода в условиях стационара. Также в испытаниях с помощью ЛАЛ-теста иммуностимулирующих компонентов из грамположительных бактерий, липопротеинов, пептидогликанов и липотейхоевых кислот могут быть получены ложноотрицательные результаты, которые могут привести к серьезным клиническим последствиям для человека [22]. В целом, метод более всего подходит для определения БЭ в водных растворах; однако его применение с целью диагностики грамотрицательного сепсиса является недостаточно специфичным [26].

Тест активации моноцитов

Анализ используется для обнаружения или количественного определения веществ, активирующих человеческие моноциты с выделением эндогенных медиаторов — провоспалительных цитокинов, например, фактора некроза опухолей α (TNF α), интерлейкина- 1β (IL- 1β)

и интерлейкина-6 (IL-6), вызывающих лихорадочное состояние [1]. Выделенные цитокины обнаруживают иммунологическими методами (EIA, ELISA) [14].

Анализ проводится в два этапа: в первый день анализа готовят разведения испытуемых препаратов, стандартов эндотоксина и неэндотоксиновых контролей. Калибровочную кривую строят с помощью растворов международного стандарта эндотоксина. Далее все разведения в четырех повторностях помещают в стерильный 96-луночный планшет, во все лунки вносят суспензию моноцитов и инкубируют планшет в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С в течение 18–22 часов. Подготовку растворов испытуемых препаратов и контролей проводят в ламинаре, соблюдая все правила работы с клетками.

Во второй день анализа супернатант из планшета с моноцитами переносят на планшет для иммуноферментного анализа (ИФА) с иммобилизованными антителами к интерлейкину-6 и определяют содержание выделившегося интерлейкина-6 с помощью метода ИФА. Далее измеряют оптическую плотность растворов при длине волны 450 нм на стандартном спектрофотометре. С помощью специального программного обеспечения или программы Excel определяют концентрацию пирогенных веществ в растворах. По калибровочной кривой определяют концентрацию пирогенных веществ: чем выше значение оптической плотности раствора, тем больше в нем концентрация интерлейкина-6 и, соответственно, пирогенных веществ [6].

Обладая преимуществами ЛАЛ-теста, МАТ дополнительно оценивает эффективность различных видов эндотоксинов и отражает воспалительную активность образца для организма человека. Преимущество этого метода перед другими — возможность анализировать такие ЛС, как препараты крови, вакцины, липидные парентеральные препараты [22]. В настоящее время МАТ может считаться методом, альтернативным испытанию на «Пирогенность» [15, 17].

Основоположниками альтернативного моделирования считают Уильяма Расселла и Рекса Берча, выступающих за более гуманный подход к использованию животных в научных исследованиях. В 1959 г. они разработали правило «Трех R», включающее в себя следующие постулаты: 1) reduction — ограничить использование животных; 2) refinement — оптимизировать эксперименты с целью минимизировать страдания животных; 3) replacement — отказаться от тех испытаний, которые можно заменить альтернативными методами [33, 36].

Однако, несмотря на определенные преимущества теста-МАТ, его также нельзя назвать универсальным, поскольку и он имеет ряд методических ограничений:

- испытание выполняется на клетках, поэтому для получения надежного результата необходимо выполнение нескольких повторностей и контролей;
- чувствительность (0,04 ЕЭ/мл) ниже, чем в ЛАЛ-тесте;
- работа с цельной кровью человека (потенциальный источник ВИЧ, гепатитов) подразумевает наличие доноров крови [24].

Даже учитывая значительный аналитический потенциал теста-МАТ по сравнению с имеющимися

методами контроля качества, все же потребуется время, чтобы ввести данный тест в существующую систему испытаний пирогенных загрязнений [25, 32, 34].

Таким образом, при сравнении трех вышеописанных тестов (табл. 1) можно сделать вывод, что каждый из методов имеет свои недостатки и свои достоинства. Однако наиболее доступным и распространенным в России и мире в настоящее время является ЛАЛ-тест, определяющий бактериальные эндотоксины. Увеличение количества доступных методов расширяет не только спектр ЛС, которые могут быть протестированы, но и спектр пирогенов, которые могут быть детектированы, что обеспечит безопасность инъекционных ЛС.

Таблица 1

Характеристика методов определения пирогенных примесей [13]

| Характеристика | Пирогенность <i>in vivo</i> | ЛАЛ-тест <i>in vitro</i> | МАТ <i>in vitro</i> |
|--------------------|---|--|---|
| Система испытания | Кролики | Лизат амебоцита (реактив из крови мечехвоста) | Клетки крови человека или линии клеток (моноциты) |
| Тип испытания | Качественное определение | Качественное определение, количественное определение | Качественное определение, количественное определение |
| Специфичность | Определяет все виды пирогенных примесей | Определяет эндотоксины | Определяет все виды пирогенных примесей |
| Предел обнаружения | 5 ЕЭ/кг | 0,005 ЕЭ/мл | 0,04 ЕЭ/мл |
| Применение | Фармацевтические продукты, биологические продукты, медицинское оборудование (смывы) | Фармацевтические продукты, биологические продукты (ограниченное количество наименований), медицинское оборудование (смывы) | Фармацевтические продукты, биологические продукты, медицинское оборудование (поверхность/смывы) |

Тесты «Пирогенность» и «ЛАЛ-тест» являются однонаправленными, так как определяют пирогенные примеси, но ввиду различий в чувствительности и специфичности они не могут быть признаны альтернативными и в производстве ЛС допускается одновременное включение в нормативную документацию (НД) обоих методов.

Заключение

Несмотря на высокую чувствительность ЛАЛ-теста, которая составляет 0,005 ЕЭ/мл, ЛАЛ-тест специфичен только к выявлению эндотоксинов и имеет ограниченное применение при анализе фармацевтических и биологических продуктов. Все виды пирогенных примесей определяются методом контроля пирогенности на кроликах или на моноцитах крови человека. При этом чувствительность метода пирогенности на кроликах гораздо меньше, чем в ЛАЛ-тесте.

Тест активации моноцитов более чувствителен, при широкой специфичности предел обнаружения МАТ составляет 0,04 ЕЭ/мл, но он примерно в десять раз менее чувствителен по сравнению с ЛАЛ-тестом. Возможно, МАТ является золотой серединой среди представленных трех методов — он обладает широкой специфичностью по отношению к пирогенным примесям, достаточной чувствительностью и проводится на клетках крови человека, что делает более обоснованным перенос полученных *in vitro* результатов оценки пирогенности на человека. В соответствии с внедрением принципов «3R» в фармакопейные методы, введение «Теста активации моноцитов» в отечественную фармакопею не только позволит сократить число испытаний на лабораторных животных, но также увеличит потенциал и обеспечит надежность методической базы Фармакопеи. Внедрение прогрессивных альтернативных методов даст возможность значительно повысить надежность контроля качества ЛС, так как указанные методы имеют преимущества в точности, воспроизводимости

и возможности количественной оценки по сравнению с экспериментами на животных. Однако методически этот процесс еще требует дополнительных исследований и валидации. Для анализа клеток цельной или криоконсервированной крови необходимо учитывать донорскую вариабельность. Этот параметр легче контролировать с помощью перевиваемой клеточной линии моноцитов. Следует провести исследование влияния реактивности клеток, их концентрации, выбор референсных пирогенных веществ, а также необходимо выбрать минимальный спектр цитокинов, уровень которых необходимо контролировать в МАТ в качестве маркеров пирогенности ЛС.

Литература

- Багирова В.Л., Митькин О.Д., Митькина Л.И. Тест на активацию моноцитов как альтернатива тесту «Пирогенность» на кроликах // Фармация. — 2010. — № 7. — С. 40–42.
- ГОСТ Р 52249-2009. Правила производства и контроля качества лекарственных средств. — М.: Стандартинформ, 2009. — 139 с.
- Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Том 1. — М.: ФЭМБ, 2018. ОФС 1.2.4.0005.15 — 1814 с.
- Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Том 1. — М.: ФЭМБ, 2018. ОФС 1.2.4.0006.15 — 1814 с.
- Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Том 1. — М.: ФЭМБ, 2018. ОФС 1.2.4.0016.18 — 1814 с.
- Государственная фармакопея СССР. 9-е изд. — М.: Медгиз, 1961.
- Карпова М.Р., Муштоватова Л.С., Бочкарева О.П., Попова Е.В., Зверева И.Ф., Грицута А.В. Методы микробиологического контроля лекарственных средств: учебное пособие / под ред. Л.С. Муштоватовой. — Томск: Изд-во СибГМУ, 2017. — 249 с.
- Копицына М.Н., Морозов А.С., Бессонов И.В., Писарев В.М., Лобакова Е.С., Бухарин О.В. Лиганды для селективного удаления бактериальных эндотоксинов грамотрицательных бактерий // Журн. микробиол. — 2017. — № 3. — С. 115–126.
- Крылов Ю.Ф., Кивман Г.Я. Биологический контроль безопасности лекарственных средств. — М.: Медицина, 1985.
- Рябцева М.С., Батуаивили Т.А., Сапожникова Г.А., Неугодова Н.П., Олефир Ю.В., Меркулов В.А. История развития и современное состояние биологических тестов в России // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. — 2016. — № 1. — С. 11–14.
- Ситников А.Г., Травина Л.А., Багирова В.Л. ЛАЛ-тест. Современные подходы к определению пирогенности. — М., 1997. — 96 с.
- Шаповалова О.В., Неугодова Н.П., Гунар О.В. Практические аспекты анализа фармацевтических субстанций по показателю «Бактериальные эндотоксины» // Научные результаты биомедицинских исследований. — 2019. — Т. 5. — № 2. — С. 62–71.
- Шаповалова О.В., Неугодова Н.П., Рябцева М.С., Агаширинова А.А., Гунар О.В. Альтернативные биологические методы оценки качества лекарственных средств // Фармация. — 2017. — Т. 66. — № 2. — С. 7–10.
- Apparao Potu, Shashidher Burra, Ajay Kumar Patil. Monocyte activation test: a new pharmacopial quality control test for pyrogens // Journal of Advanced Pharmaceutical Sciences. — 2011. — Vol. 1. — No. 1. — P. 123–131.
- Borton L.K., Coleman K.P. Material-mediated pyrogens in medical devices: Applicability of the in vitro Monocyte Activation Test // ALTEX. — 2018. — Vol. 35. — No. 4. — P. 453–463.
- British Pharmacopeia, 2023.
- Brown J., Clippinger A.J., Fritz Briglia C., Casey W., Coleman K., Fritsch A., Hartung T., Maouyo D., Muller T., Reich J., Robert L., Roeder R., Sanchez G., Sawyer A.Y., Solati S., Tirumalai R., Zwisler W., Allen D. Using the monocyte activation test as a stand-alone release test for medical devices // ALTEX. — 2021. — Vol. 38. — No. 1. — P. 151–156.
- Chen L., Mozier N. Comparison of Limulus amebocyte lysate test methods for endotoxin measurement in protein solutions // J. Pharm. & Biomed. Analysis. — 2013. — Vol. 80. — P. 180–185.
- European pharmacopoeia 11, 2023.
- Fiske J.M., Ross A., Meid R.K., McMichael J.C., Arumugham M. Method for reducing endotoxin in Moraxella catarrhalis UspA2 protein preparations // J. Chrom. B. — 2007. — Vol. 753. — P. 269–278.
- Grallert H., Leopoldseder S., Schuett M., et al. EndoLISA®: a novel and reliable method for endotoxin detection // Nat Methods 8, iii–v (2011). doi: 10.1038/nmeth.f.350.
- Hasiwa N., Daneshian M., Bruegger P., Fennrich S. et al. Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test // ALTEX. — 2013. — Vol. 30. — No. 2. — P. 169–208. doi: 10.14573/altex.2013.2.169. Erratum in: ALTEX. — 2013. — Vol. 30. — No. 3. — P. 352. doi: 10.14573/altex.2013.3.352. Erratum in: ALTEX. — 2014. — Vol. 31. — No. 2. — P. 226. doi: 10.14573/altex.2014.2.226.
- Hort E.C., Penfold W.J. The dangers of saline injections // Br. Med. J. — 1911. — Vol. 2. — Art. 1589. doi: 10.1136/bmj.2.2659.1589.
- Kerecman Myers D., Goldberg A.M., Poth A., Wolf M.F., Carraway J., McKim J., Coleman K.P., Hutchinson R., Brown R., Krug H.F., Bahinski A., Hartung T. From in vivo to in vitro: The medical device testing paradigm shift // ALTEX. — 2017. — Vol. 34. — No. 4. — P. 479–500.

25. Kim J.H., Jung K., Kim J., Lee J., Kim H., Song H., Han K., Park S., Ahn C., Kim C.W. Development of a rabbit monocyte activation test as an alternative to the rabbit pyrogen test and its application in the analysis of plasma-derived products // *Biologicals*. — 2021. — Vol. 71. — P. 20–30.
26. Kopitsyna M., Morozov A., Bessonov I., Pisarev V. Methods for detection of bacterial endotoxin in critical care medicine // *General Reanimatology*. — 2017. — Vol. 13(5). — P. 109–120.
27. Levin J., Bang F.B. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood // *Bull. Johns Hopkins Hosp.* — 1964. — Vol. 115. — P. 265–274.
28. Mazzotti F., Beuttler J., Zeller R., Fink U., Schindler S., Wendel A., Hartung T., von Aulock S. In vitro pyrogen test--A new test method for solid medical devices // *J. Biomed. Mater. Res. A*. — 2007. — Vol. 80. — No. 2. — P. 276–282.
29. Ogikubo Y., Norimatsu M., Noda K., Takahashi J., Inotsume M., Tsuchiya M. Evaluation of the bacterial endotoxin test for quantification of endotoxin contamination of porcine vaccines // *Biologicals*. — 2004. — Vol. 32. — P. 88–93.
30. Pearson F.C. *Pyrogens*. — NY.: 1985. — P. 105–117.
31. *Piervincenzi R.T. USP XXIV. United States Pharmacopeia Convention*. — Rockville MD: United States Pharmacopeia, 2000. — P. 15.
32. Reich J., Weyer F.A., Tamura H., Nagaoka I., Motschmann H. Low endotoxin recovery--masking of naturally occurring endotoxin // *Int. J. Mol. Sci.* — 2019. — Vol. 20. — No. 4. — Art/ 838. doi: 10.3390/ijms20040838.
33. Russell W.M.S., Burch R.L. *The principles of humane experimental technique*. — London: Methuen, reprinted 1992. — 238 p.
34. Schwarz H., Gornicec J., Neuper T., Parigiani M.A., Wallner M., Duschl A., Horejs-Hoeck J. Biological activity of masked endotoxin // *Sci. Rep.* — 2017. — Vol. 7. — Art. 44750. doi: 10.1038/srep44750.
35. Su W., Ding X. Methods of endotoxin detection // *J. Lab. Autom.* — 2015. — Vol. 20. — No. 4. — P. 354–364.
36. Thurman T.L., Lahti C.J., Mateffy J.M., Forng R.Y., von Wintzingerode F., Silva L.M., Deutschmann S.M., Mozier N. Comparison of pyrogen assays by testing products exhibiting low endotoxin recovery // *ALTEX*. — 2023. — Vol. 40. — No. 1. — P. 117–124.
37. Weary M. *Pyrogens: endotoxins, LAL-testing, and depyrogenation*. Ed. F.C. Pearson. — Marsel Deccer. Inc. N.Y., 1985. — P. 104–118.
38. Williams K.L. (ed.). *Endotoxins: pyrogens, LAL testing, and depyrogenation*. 2nd ed. — N.Y.: Marcel Dekker Inc., 2001.
2. GOST R 52249-2009. *Pravila proizvodstva i kontrolya kachestva lekarstvennykh sredstv*. Moscow: Standartinform, 2009: 139 (in Russian).
3. *Gosudarstvennaya farmakopeya SSSR. 9-ye izd.* Moscow: Medgiz, 1961 (in Russian).
4. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii XIV izdaniya. Tom 1.* Moscow: FEMB, 2018. OFS 1.2.4.0006.15: 1814 (in Russian).
5. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii XIV izdaniya. Tom 1.* Moscow: FEMB, 2018. OFS 1.2.4.0005.15: 1814 (in Russian).
6. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii XIV izdaniya. Tom 1.* Moscow: FEMB, 2018. OFS 1.2.4.0016.18: 1814 (in Russian).
7. Karpova MR, Mushtovatova LS, Bochkareva OP, Popova YeV, Zvereva IF, Gritsuta AV. *Metody mikrobiologicheskogo kontrolya lekarstvennykh sredstv: uchebnoye posobiye, pod red LS Mushtovatovoy*. Tomsk: Izd-vo SibGMU, 2017: 249 (in Russian).
8. Kopitsyna MN, Morozov AS, Bessonov IV, Pisarev VM, Lobakova YeS, Bukharin OV. *Ligandy dlya selektivnogo udaleniya bakterial'nykh endotoksinov gramotritsatel'nykh bakteriy*. *Zhurn mikrobiol* 2017; 3:115–126 (in Russian).
9. Krylov YuF, Kivman GYa. *Biologicheskii kontrol' bezopasnosti lekarstvennykh sredstv*. Moscow: Meditsina, 1985 (in Russian).
10. Ryabtseva MS, Batuashvili TA, Sapozhnikova GA, Neugodova NP, Olefir YuV, Merkulov VA. *Istoriya razvitiya i sovremennoye sostoyaniye biologicheskikh testov v Rossii*. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* 2016; 1:11–14 (in Russian).
11. Sitnikov AG, Travina LA, Bagirova VL. *LAL-test. Sovremennyye podkhody k opredeleniyu pirogenosti*. — Moscow, 1997: 96 (in Russian).
12. Shapovalova OV, Neugodova NP, Gunar OV. *Prakticheskiye aspekty analiza farmatsevticheskikh substantsiy po pokazatelyu «Bakterial'nyye endotoksiny»*. *Nauchnyye rezul'taty biomeditsinskikh issledovaniy* 2019; 5(2):62–71 (in Russian).
13. Shapovalova OV, Neugodova NP, Ryabtseva MS, Agashirina AA, Gunar OV. *Al'ternativnyye biologicheskiye metody otsenki kachestva lekarstvennykh sredstv*. *Farmatsiya* 2017; 66(2):7–10 (in Russian).
14. Apparao Potu, Shashidher Burra, Ajay Kumar Patil. *Monocyte activation test: a new pharmacoepial quality control test for pyrogens*. *Journal of Advanced Pharmaceutical Sciences* 2011; 1(1):123–131.
15. *British Pharmacopeia*, 2023.
16. Borton LK, Coleman KP. *Material-mediated pyrogens in medical devices: Applicability of the in vitro Monocyte Activation Test*. *ALTEX* 2018; 35(4):453–463.
17. Brown J, Clippinger AJ, Fritz Briglia C, Casey W, Coleman K, Fritsch A, Hartung T, Maouyo D, Muller T, Reich J, Robert L, Roeder R, Sanchez G, Sawyer AY, Solati S, Tirumalai R, Zwisler W, Allen D. *Using the monocyte activation*

References

1. Bagirova VL, Mit'kin OD, Mit'kina LI. *Test na aktivatsiyu monotsitov kak al'ternativa testu «Pirogenost'» na krolikakh*. *Farmatsiya* 2010; 7:40–42 (in Russian).

- test as a stand-alone release test for medical devices. *ALTEX* 2021; 38(1):151–156.
18. Chen L, Mozier N. Comparison of *Limulus* amebocyte lysate test methods for endotoxin measurement in protein solutions. *J Pharm & Biomed Analysis* 2013; 80:180–185.
 19. European pharmacopoeia 11, 2023.
 20. Fiske JM, Ross A, Meid RK, McMichael JC, Arumugham M. Method for reducing endotoxin in *Moraxella catarrhalis* UspA2 protein preparations. *J Chrom B* 2007; 753:269–278.
 21. Grallert H, Leopoldseder S, Schuett M, et al. EndoLISA®: a novel and reliable method for endotoxin detection. *Nat Methods* 8, iii–v (2011). doi: 10.1038/nmeth.f.350.
 22. Hasiwa N, Daneshian M, Bruegger P, Fennrich S et al. Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test. *ALTEX* 2013; 30(2):169–208. doi: 10.14573/altex.2013.2.169. Erratum in: *ALTEX* 2013; 30(3):352. doi: 10.14573/altex.2013.3.352. Erratum in: *ALTEX* 2014; 31(2):226. doi: 10.14573/altex.2014.2.226.
 23. Hort EC, Penfold WJ. The dangers of saline injections. *Br. Med J* 1911; 2:1589. doi: 10.1136/bmj.2.2659.1589.
 24. Kerecman Myers D, Goldberg AM, Poth A, Wolf MF, Carraway J, McKim J, Coleman KP, Hutchinson R, Brown R, Krug HF, Bahinski A, Hartung T. From in vivo to in vitro: The medical device testing paradigm shift. *ALTEX* 2017; 34(4):479–500.
 25. Kim JH, Jung K, Kim J, Lee J, Kim H, Song H, Han K, Park S, Ahn C, Kim CW. Development of a rabbit monocyte activation test as an alternative to the rabbit pyrogen test and its application in the analysis of plasma-derived products. *Biologicals* 2021; 71:20–30.
 26. Kopitsyna M, Morozov A, Bessonov I, Pisarev V. Methods for detection of bacterial endotoxin in critical care medicine. *General Reanimatology* 2017; 13(5):109–120.
 27. Levin J, Bang FB. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull. Johns Hopkins Hosp* 1964; 115:265–274.
 28. Mazzotti F, Beuttler J, Zeller R, Fink U, Schindler S, Wendel A, Hartung T, von Aulock S. In vitro pyrogen test--A new test method for solid medical devices. *J Biomed Mater Res A* 2007; 80(2): 276–282.
 29. Ogikubo Y, Norimatsu M, Noda K, Takahashi J, Inotsume M, Tsuchiya M. Evaluation of the bacterial endotoxin test for quantification of endotoxin contamination of porcine vaccines. *Biologicals* 2004; 32:88–93.
 30. Pearson FC. *Pyrogens*. NY: 1985: 105–117.
 31. Piervincenzi RT. *USP XXIV. United States Pharmacopeia Convention*. Rockville MD: United States Pharmacopeia, 2000: 15.
 32. Reich J, Weyer FA, Tamura H, Nagaoka I, Motschmann H. Low endotoxin recovery-masking of naturally occurring endotoxin. *Int J Mol Sci* 2019; 20(4):838. doi: 10.3390/ijms20040838.
 33. Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen, reprinted 1992: 238.
 34. Schwarz H, Gornicec J, Neuper T, Parigiani MA, Wallner M, Duschl A, Horejs-Hoeck J. Biological activity of masked endotoxin. *Sci Rep* 2017; 7:44750. doi: 10.1038/srep44750.
 35. Su W, Ding X. Methods of endotoxin detection. *J Lab Autom* 2015; 20(4):354–364.
 36. Thurman TL, Lahti CJ, Mateffy JM, Forng RY, von Wintzingerode F, Silva LM, Deutschmann SM, Mozier N. Comparison of pyrogen assays by testing products exhibiting low endotoxin recovery. *ALTEX* 2023; 40(1):117–124.
 37. Weary M. *Pyrogens: endotoxins, LAL-testing, and depyrogenation*. Ed FC Pearson. Marsel Deccer. Inc NY, 1985: 104–118.
 38. Williams KL (ed). *Endotoxins; pyrogens, LAL testing, and depyrogenation*. 2nd ed. NY: Marcel Dekker Inc, 2001.

PYROGENICITY CONTROL METHODS FOR ASSESSING THE QUALITY OF MEDICINES

M.V. BULATOVA, A.B. RYZHIKOV, S.V. USOVA, M.P. BOGRYANTSEVA

State Scientific Center for Virology and Biotechnology «Vector» of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare, r.p. Koltsovo, Novosibirsk region

A review of works on the problem of pyrogenicity to assess the quality of medicines was carried out. A comparison was made of three tests used to control pyrogenicity. The first method for determining all pyrogens, including endotoxins, involves the use of animals – rabbits. The second method, which is of dominant importance throughout the world, is the highly sensitive and specific LAL test, which allows the determination of bacterial endotoxins. The third method is the monocyte activation test (MAT), which makes it possible to determine both bacterial endotoxins and non-endotoxin pyrogens. The monocyte activation test is more sensitive than the method for determining pyrogenicity in rabbits – with broad specificity, the detection limit of MAT is 0.04 EU/ml, but it is approximately ten times less sensitive compared to the LAL test. Perhaps MAT is the golden mean among the three methods presented.

Keywords: pyrogenicity, control, methods, test on rabbits, LAL test, monocyte activation test, reviews.

Address:

Bulatova M.V.
postgraduate student, 2nd category technologist
of the department of biological and technological control
of the Federal Budgetary Institution State Scientific
Center for Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor
E-mail: mari.bulatova.90@mail.ru

Для цитирования:

Булатова М.В., Рыжиков А.Б., Усова С.В., Богрянцева М.П. Методы контроля пирогенности для оценки качества лекарственных средств. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2024; 20(1):73–81.

For citation:

Bulatova M.V., Ryzhikov A.B., Usova S.V., Bogryantseva M.P. Pyrogenicity control methods for assessing the quality of medicines. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(1):73–81 (in Russian).

ОСОБЕННОСТИ ПОЧВЕННОЙ ФАЗЫ СУЩЕСТВОВАНИЯ *BACILLUS ANTHRACIS*

А.В. КАЛИНИН, Е.А. КОТЕНЕВА*, О.И. ЦЫГАНКОВА, А.В. АБРАМОВИЧ

ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь

Возбудитель сибирской язвы — *Bacillus anthracis* — обладает адаптационными механизмами для существования в различающихся условиях: в организме млекопитающих и окружающей среде (почве). Непродолжительная фаза существования в организме чувствительных животных подчинена цели быстрого и продуктивного размножения независимо от исхода заболевания животного. Учитывая длительность «почвенной» фазы существования *B. anthracis* и ее важность в формировании резервуара инфекции, очевидна необходимость изучения всех факторов и процессов, оказывающих воздействие на сибиреязвенный микроб в этой сложной и многофакторной экологической системе. Авторами рассмотрены различные стратегии выживания возбудителя сибирской язвы в почвенной среде, такие как локусное развитие в момент наиболее благоприятных условий в почве, существование в виде биопленки ризосферы растений, колонизация кишечника червей и насекомых, хищничество по отношению к почвенным амёбам. Понимание того, как сибиреязвенный микроб сохраняется в почвенных системах и взаимодействует с ее обитателями, будет способствовать лучшему пониманию эпидемиологии и экологии *B. anthracis* и оценки этих явлений для формирования и сохранения стойких почвенных очагов сибиреязвенной инфекции

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, почва, жизненный цикл, плазмиды, спорообразование, адаптация.

Введение

Сибирская язва является природно-очаговым нетрансмиссивным сапрозооозом с почвенной локализацией резервуара и источника заражения для млекопитающих, в первую очередь травоядных копытных, имеющих естественные контакты с почвой [4].

Возбудитель сибирской язвы обладает адаптационными механизмами для существования в различающихся условиях: в организме млекопитающих и внешней среде. Каждая из этих фаз обусловлена функционально и направлена на сохранение вида *B. anthracis*. Непродолжительная фаза существования в организме чувствительных животных подчинена цели быстрого и продуктивного размножения независимо от исхода заболевания животного. Включение таких механизмов нейтрализации защитных факторов макроорганизма, как капсула и токсины, позволяет при генерализации процесса получать очень высокую концентрацию в биоматериале

бацилл, прошедших отбор по признаку вирулентности. В отличие от некоторых патогенных микроорганизмов, обладающих низкой устойчивостью во внешней среде, для *B. anthracis* при размножении бацилл гибель организма хозяина не является фатальной, так как существуют механизмы, позволяющие сохранить популяцию возбудителя, полученную на протяжении фазы размножения. В естественных условиях (в отсутствие специальных мер человека) на протяжении длительного процесса эволюции сибиреязвенного микроба бациллы вместе с трупом и биологическими жидкостями попадали в почву, где происходил процесс формирования спор, обеспечивающий их длительное сохранение [10, 11].

Учитывая длительность «почвенной» фазы существования *B. anthracis* и ее важность в формировании резервуара инфекции, очевидна необходимость изучения всех факторов и процессов, оказывающих воздействие на микроб в этой сложной и многофакторной экологической системе.

Цель данного обзора литературы является оценка системы *B. anthracis* — почва как многофакторной среды обитания, позволяющей сохранять и развивать популяцию сибиреязвенного микроба.

Основная часть обзора

Несмотря на то, что общепризнанной ведущей функцией почвенной фазы существования возбудителя

© 2024 г. Калинин А.В., Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Абрамович А.В.

* Автор для переписки:

Котенева Елена Анатольевна

кандидат биологических наук, заведующая лабораторией постгеномных технологий, ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора

E-mail: postgenom_stv@mail.ru

сибирской язвы является длительное сохранение микроба в виде спор, в научной литературе активно обсуждается вопрос и о возможности вегетирования сибиреязвенного микроба в почве, впервые поднятый в работе [34].

Процесс спорообразования играет важную роль в жизненном цикле сибиреязвенного микроба, поскольку именно спора в большинстве случаев служит инфицирующим агентом для животных и в то же время обеспечивает сохранение популяции и отдельных клеток при наступлении неблагоприятных условий. В научной литературе нет однозначного мнения по поводу способности спор сохраняться и вегетировать в течение определенного времени после попадания в почву. Однако очевидно, что эта способность во многом зависит от конкретных условий окружающей среды. Так, почвы со слабощелочным рН, высоким содержанием органических веществ и кальция способны на протяжении длительного периода времени сохранять жизнеспособные споры *B. anthracis* [14]. Кроме того, в работе [36] показано, что структурные особенности экзоспориума клеток сибиреязвенного микроба влияют на их способность сохраняться в почвах разных типов.

Подтверждением существования вегетативной фазы в почве может служить тот факт, что в определенных условиях *B. anthracis* может расти *in vitro* в виде биопленки [16], которая, как известно, является предпочтительным состоянием для микроорганизмов в окружающей среде. Действительно, в опыте, описанном Saile and Koehler [24], размножение наблюдалось в условиях почвы в ризосфере растений, где *B. anthracis* образовывал длинные цепи, схожие с бактериальными цепями, обнаруженными в биопленках. *B. anthracis* также может продуцировать биопленки в статических условиях и в условиях течения [26]. Он экспрессирует регуляторы, необходимые для образования биопленки, и некоторую часть протейных компонентов матрицы биопленки [18, 21] и может спорулировать в биопленках. Кроме того, показана возможность *B. anthracis* колонизировать кишечник дождевого червя в течение длительного времени [26], а также описаны подобные случаи для мух и комаров [27], хотя наблюдалась только кратковременная колонизация кишечника мух [12]. В свете этих данных необходимо отметить, что *B. anthracis* находится в близком генетическом родстве с группой очень успешных почвенных микроорганизмов, называемой *B. cereus sensu lato* [22]. Плеоморфизм в рамках этой линии паразителен, учитывая, что сравнительная геномика показывает относительно незначительные генетические различия: хромосома *B. anthracis* в основном отличается

только четырьмя интегрированными неиндуцибельными профагами [26] и единственной нонсенс-мутацией [19], которая инактивирует транскрипционный регулятор ρ lcR. Таким образом одинаковый набор основных генов поддерживает несколько разных форм существования [15, 35]. Выживанию бацилл, в том числе *B. anthracis* в окружающей среде и расширению их экологических ниш, могут способствовать бактериофаги [26]. Общеизвестным является факт, что фаги, находящиеся в лизогенном состоянии (профаги), используя ряд механизмов, в том числе передачу генов приспособленности к внешним условиям, способны изменять фенотип хозяина [7].

Сложные экологические взаимодействия в почве с протистами описаны в двух экспериментальных работах [5, 9]. В первом исследовании показана возможность прорастания и накопления спор в амебах. Выяснено, что критически важно наличие на раннем этапе процесса прорастания и роста фактора, кодируемого плазмидой ρ X01. В то же время показано, что этот процесс не зависит от экзотоксинов, которые генерируются при взаимодействии с макрофагами млекопитающих. Это говорит о том, что, по крайней мере, один неохарактеризованный ген на ρ X01, который независим от экзотоксинов и оперона *gerX*, жизненно важен для размножения *B. anthracis* в присутствии амеб. Кроме того, установлено, что более низкие температуры могут способствовать накоплению в амебах штаммов *B. anthracis*, которые содержат обе плазмиды, в то время как при 37 °C или выше вторая плазида при отборе теряется. Это подразумевает, что температура окружающей среды может влиять на сохранение или потерю вирулентных плазмид. Это может помочь объяснить, почему изоляты *B. anthracis*, лишенные ρ X02, были обнаружены в окружающей среде, но без ρ X01 не встречались [23].

В работе [5] был проведен модельный опыт по выявлению взаимодействий между почвенными амебами *A. polyphaga* и *D. discoideum* и представителями группы *Bacillus cereus*. В ходе эксперимента рассматривалось предположение, что одноклеточные эукариоты в окружающей среде могут выступать в качестве «тренировочных площадок» для эволюции новых видов механизмы уклонения от клеточного иммунитета (Molmeret et al., 2005) (Уотерфилд и др., 2004). Огромное количество «взаимодействий» между протистами и бактериями в почве, а также продолжающееся давление отбора хищников со стороны протист стимулирует интенсивную гонку вооружений генетической новизны. Эти наблюдения привели к предположению, что бактерии эволюционировали и стали внутриклеточными патогенами после выживания

при фагоцитозе и адаптации к внутриклеточной среде простейших. Констатирована возможность бактерий группы *B. cereus* модифицировать поведение и форму развития зависимости от присутствия и относительного количества клеток хищной амебы. Это количественное соотношение позволяет реализовать несколько стратегии взаимодействия бактерий с амебой. К ним относятся: прорастание спор, когда они ощущают присутствие амеб с последующей поверхностной колонизацией и ингибированием фагоцитоза, образование нитей/цепей, которые препятствуют проглатыванию амебами.

В работах отечественных исследователей [1, 4] указывается, что жизненный цикл сибиреязвенного микроба соответствует паразитоидизму, который отличается от классического паразитизма тем, что в данном случае не происходит полноценной взаимовыгодной эволюционной коадаптации, а летальность хозяина обязательна для высвобождения паразитоида и последующих стадий его жизненного цикла, включая сапрофитическую стадию существования в почве.

Попадание сибиреязвенных бактерий в виде вегетативной культуры в почву, которая представляет собой устоявшуюся экосистему, вызывает необходимость перестройки механизмов регуляции экспрессии различных белковых продуктов, влияющих на обменные процессы, качественно или количественно изменяя синтез веществ, формирующих поверхностные структуры клеток (возможность снизить агрессивное влияние бактериофагов, почвенных сапрофитных бактерий, бактериоцинов), продуцировать собственные бактериоцины, повышающие шансы в конкурентной борьбе с почвенными бактериями. В этих условиях преимущество могут получить штаммы *B. anthracis* с ускоренным спорообразованием, что даст возможность обеспечить эффективное использование непродолжительных периодов времени с благоприятным для вегетирования и завершения спорообразования сочетанием почвенно-климатических условий. Многие генетические характеристики и фенотипические свойства *B. anthracis* подвержены вариабельности, что позволяет предположить существование типов штаммов, наиболее адаптированных к стабильному сохранению в виде спор или к длительному активному функционированию в макроорганизме [2, 3].

В работе [8] рассматривается возможность выделения экотипов (экологический вклад) бактерий на основе анализа геномных данных в специализированном программном обеспечении (Ecotypesimulation, AdaptML), которое позволяет связать (сопоставить) изменения в окружающей среде с генетическими особенностями

штаммов, занимающими определенную экологическую нишу. В работе показано, что ведущую роль в дивергенции разных экотипов бактерий имеет уровень инсоляции и текстура почвы. Существуют также работы [37], рассматривающие влияние других факторов, например, уровня CO₂ на формирование функциональных молекулярных экологических сетей в микробных сообществах. Авторы выявили, что при изменении уровня CO₂ в почве резко меняются сетевые взаимодействия между функциональными генами и популяциями микроорганизмов. Аналогичный сдвиг в структуре сети по данным исследователей вызывают геохимические изменения в почве. Таким образом, выяснение сетевых взаимодействий в сообществах микробов и их реакции на изменения в окружающей среде является фундаментально важным для исследований в области микробной экологии, системной микробиологии и глобальных изменений. Эти данные указывают на то, что штаммы возбудителя сибирской язвы, имеющие в качестве основы функционирования различный набор структурных и регуляторных генов, при попадании в почву в виде вегетативной или споровой формы в различной степени могут адаптироваться к существованию в этой среде — длительно сохраняться в виде жизнеспособных спор, увеличивать концентрацию возбудителя при смене циклов вегетирования и эффективного спорообразования (особенно в локальных почвенных очагах, где вследствие разложения трупов животных значительно изменяется баланс питательных веществ) или постепенно элиминируются из почвы по причине неспособности образовывать споры во время первичного попадания в почву в виде вегетативной культуры или при прорастании спор в почве при необходимости длительного периода спорообразования в качестве индивидуальной особенности штаммов, которые могут не совпадать с фазой благоприятных водно-климатических условий.

Экологические и генетические факторы, которые обуславливают возникновение резервуаров сибирской язвы и их устойчивое сохранение в окружающей среде, не совсем понятны. Длительное время господствовала точка зрения о том, что вегетативные формы *B. anthracis* плохо выживают вне организма хозяина-млекопитающего, и поэтому в окружающей среде им приходится образовывать споры. Однако ряд работ последнего времени свидетельствует о том, что данный взгляд нуждается в пересмотре. Экологическую основу представления о том, что судьба *B. anthracis* в окружающей среде, связана исключительно со споровой формой, подкрепляют такие факты, как длительная сохранность и устойчивость спор бактерий [20], в том числе спор *B. anthracis* [10], наблюдаемая в лабораторных

условиях слабая жизнеспособность вегетативных форм некоторых штаммов *B. anthracis* в образцах воды и почвы [17, 29], а также длительно выявляемая контаминация спорами мест вокруг погибших от сибирской язвы трупов животных [11, 30]. Интересные данные приводятся в работе [33], в которой исследовано влияние на микробиом почвы процесса разложения туши животного, погибшего от сибиреязвенной инфекции, которая рассматривается как комплекс биотических (добавление новых микроорганизмов) и абиотических (поступление питательных веществ и влаги) факторов. Было обнаружено, что количество клеток *B. anthracis* увеличивается в ризосферной области почвы на второй год после разложения [32], что, однако, противоречит аналогичной работе [13], в которой указывается, что размножение клеток *B. anthracis* прекращается вскоре после гибели инфицированного животного. В том же исследовании [32] описывается увеличение биомассы растений на локальных участках почвы, что связано, скорее всего, с высвобождением питательных веществ из разлагающейся туши животного. В свою очередь, обильная биомасса растений привлекает травоядных, что увеличивает вероятность их инфицирования находящимися в почве и ризосфере растений спорами *B. anthracis*. Анализ образцов почвы, взятых в местах разложения туш, выявил волнообразный характер изменения количества спор *B. anthracis*, который характеризуется увеличением количества спор на 7- и 14-е сутки, резким падением на 21-е сутки и повторным подъемом к 30 суткам. Параллельно с этим авторы зафиксировали таксономический сдвиг в микробном сообществе, который сопровождался сдвигом метаболического потенциала [33]. По мнению исследователей, количественный рост таксонов группы RGPBs (plantgrown-promoting bacteria) может сыграть роль в передаче *B. anthracis* чувствительным травоядным животным.

В ряде работ [28, 31] описывается выявленная длительная, не снижающаяся на протяжении многих лет контаминация спорами, несмотря на воздействие таких природных факторов, как ветер, дождь и солнечный свет, которые должны бы уменьшить количество спор. Очень интересные данные о возможности вегетирования *B. anthracis* в почве представлены в работе [6], в которой, авторы, используя современные методы генетического и геномного анализа с разной дискриминирующей способностью (MLVA, SNR, SNP, WGS), проследили микроэволюционные изменения изолятов *B. anthracis*, выделенных из почвы на месте гибели животного с разной глубины за определенный период времени. В результате анализа полученных данных авторы сделали

вывод о наличии спорадической вегетации *B. anthracis* в поверхностных слоях почвы.

Рассматривая действие фагов как один из механизмов, способствующих формированию фенотипов бактерий, в первую очередь сибиреязвенного микроба, благоприятных для выживания в почве, [25] проводили оценку влияния лизогении на способность к длительному выживанию штаммов *B. anthracis* и *B. cereus* из окружающей среды в условиях, имитирующих условия почвы. Авторы нашли, что спустя 3 месяца лизогены образуют крупные, богатые экзополисахаридом биопленки, которые, будучи обусловлены наличием лизогении, тесно связаны и, возможно, необходимы для осуществления долгосрочной колонизации среды обитания — почвы.

Заключение

Почва — уникальная среда обитания микроорганизмов, гетерогенная по структуре и имеющая мозаичное строение. Чтобы правильно оценить роль почвы в экологии и эволюции бактерий следует понимать, что данный субстрат представляет собой совокупность множества очень мелких агрегатов, пронизанных порами, омываемыми почвенным раствором, протекающим по капиллярам. Остатки растений и животных, гумусовые вещества распределены в ней не равномерно, а сосредоточены в отдельных микроочагах, где протекает бурная, но непродолжительная деятельность микробных сообществ, заселяющих эти участки. Представленные в обзоре стратегии выживания возбудителя сибирской язвы в почвенной среде показывают наличие у *B. anthracis* возможности существования в виде биопленки ризосферы растений, колонизации кишечника червей и насекомых, хищничества по отношению к почвенным амёбам. Реализация данных вариантов существования и размножения происходит по типу локусного развития — в момент сочетания наиболее благоприятных условий в почве. Концепции и опыты, описывающие возможные варианты накопления спор и вегетирования клеток *B. anthracis* в таких условиях, носят зачастую модельный характер и требуют дальнейшего всестороннего изучения и проведения опытов, более приближенных к естественным условиям почвенной среды. Понимание того, как этот организм сохраняется в почвенных системах и взаимодействует с ее обитателями, будет способствовать лучшему пониманию эпидемиологии и микробной экологии *B. anthracis* и потенциально позволит разработать методы, способствующие в борьбе с сибиреязвенными загрязнениями окружающей среды.

Литература

- Макаров В.В., Брико Н.И. Мировой нозоареал сибирской язвы // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. — 2011. — № 2. — С. 13–18.
- Онищенко Г.Г., Васильев Н.Г., Литусов Н.В., Харченко А.Т., Васильев П.Г., Садовой Н.В., Кожухов В.В. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики. — М.: ВУНМЦ МЗ РФ, 1999. — 448 с.
- Цыганкова О.И., Еременко Е.И., Цыганкова Е.А., Буравцева Н.П., Рязанова А.Г. Фенотипические и генетические особенности культурально-морфологических вариантов *Bacillus anthracis* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2008. — № 4. — С. 6–11.
- Ямтитина М.Н., Макаров В.В. Экология сибирской язвы / Ж. «Труды федерального центра охраны здоровья животных». — 2018. — Т. 16. — С. 44–53.
- Beeton M.L., Atkinson D.J., Waterfield N.R. An amoeba phagocytosis model reveals a novel developmental switch in the insect pathogen *Bacillus thuringiensis* // J. Insect. Physiol. — 2013. — Vol. 59. — No. 2. — P. 223–231.
- Braun P., Grass G., Aceti A., Serrecchia L., Affuso A., Marino L., Grimaldi S., Pagano S., Hanczaruk M., Georgi E., Northoff B., Schöler A., Schloter M., Antwerpen M., Fasanella A. Microevolution of anthrax from a young ancestor (M.A.Y.A.) suggests a soil-borne life cycle of *Bacillus anthracis* // PLoS One. — 2015. — Vol. 10. — No. 8. — e0135346. doi: 10.1371/journal.pone.0135346.
- Brussow H., Can Chaya C., Hardt W.D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 2004. — Vol. 68. — No. 3. — P. 560–602.
- Connor N., Sikorski J., Rooney A.P., Kopac S., Koeppl A.F., Burger A., Cole S.G., Perry E.B., Krizanc D., Field N.C., Slaton M., Cohan F.M. Ecology of speciation in the genus *Bacillus* // Appl. Environ. Microbiol. — 2010. — Vol. 76. — No. 5. — P. 1349–1358.
- Dey R., Hoffman P.S., Glomski I.J. Germination and amplification of anthrax spores by soil-dwelling amoebas // Appl. Environ. Microbiol. — 2012. — Vol. 78. — No. 22. — P. 8075–8081.
- Dragon D.C., Bader D.E., Mitchell J., Woollen N. Natural dissemination of *Bacillus anthracis* spores in northern Canada // Appl. Environ. Microbiol. — 2005. — Vol. 71. — No. 3. — P. 1610–1615.
- Dragon D.C., Rennie R.P. The ecology of anthrax spores: tough but not invincible // Canadian Veterinary Journal. — 1995. — Vol. 36. — P. 295–301.
- Fasanella A., Galante D., Garofolo G., Jones M.H. Anthrax undervalued zoonosis // Veterinary Microbiology. — 2010. — Vol. 140. — Issues 3–4. — P. 318–331.
- Ganz H.H., Turner W.C., Brodie E.L., Kusters M., Shi Y., Sibanda H., Torok T., Getz W.M. Interactions between *Bacillus anthracis* and plants may promote anthrax transmission // PLoS Negl. Trop. Dis. — 2014. — Vol. 8. — No. 6. — e2903. doi: 10.1371/journal.pntd.0002903.
- Hugh-Jones M., Blackburn J. The ecology of *Bacillus anthracis* // Mol. Aspects Med. — 2009. — Vol. 30. — No. 6. — P. 356–367.
- Ivanova N., Sorokin A., Anderson I., Galleron N., Candelon B., et al. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis* // Nature. — 2003. — Vol. 423. — P. 87–91.
- Lee K., Costerton J.W., Ravel J., Auerbach R.K., Wagner D.M., et al. Phenotypic and functional characterization of *Bacillus anthracis* biofilms // Microbiology. — 2007. — Vol. 153. — P. 1693–1701.
- Lindeque P.M., Turnbull P.C. Ecology and epidemiology of anthrax in the Etosha National Park, Namibia // Onderstepoort J. Vet. Res. — 1994. — Vol. 61. — No. 1. — P. 71–83.
- Majed R., Faille C., Kallassy M., Gohar M. *Bacillus cereus* biofilms — same, only different // Front. Microbiol. — 2016. — Vol. 7. — Art. 1054. doi: 10.3389/fmicb.2016.01054.
- Mignot T., Mock M., Robichon D., Landier A., Lereclus D., et al. The incompatibility between the PlcR- and AtxA-controlled regulons may have selected a nonsense mutation in *Bacillus anthracis* // Mol. Microbiol. — 2001. — Vol. 4. — No. 2. — P. 1189–1198.
- Nicholson W.L., Munakata N., Horneck G., Melosh H.J., Setlow P. Resistance of *Bacillus endospores* to extreme terrestrial and extraterrestrial environments // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 2000. — Vol. 64. — P. 548–572.
- Pflughoeft K.J., Sumbly P., Koehler T.M. *Bacillus anthracis* sin locus and regulation of secreted proteases // J. Bacteriol. — 2011. — Vol. 193. — No. 3. — P. 631–639.
- Rasko D.A., Altherr M.R., Han C.S., Ravel J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms // FEMS Microbiol. Rev. — 2005. — Vol. 29. — P. 303–329.
- Read T.D., Peterson S.N., Tourasse N., Baillie L.W., Paulsen I.T., et al. The genome sequence of *Bacillus anthracis*. Ames and comparison to closely related bacteria // Nature. — 2003. — Vol. 423. — P. 81–86.
- Saile E., Koehler T.M. *Bacillus anthracis* multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants // Appl. Environ. Microbiol. — 2006. — Vol. 72. — P. 3168–3174.
- Schuch R., Fischetti V.A. The secret life of the anthrax agent *Bacillus anthracis*: bacteriophage-mediated ecological adaptations // PLoS One. — 2009. — Vol. 4. — No. 8. — e6532. doi: 10.1371/journal.pone.0006532.
- Sozhamannan S., Chute M.D., Mc Afee F.D., Fouts D.E., Akmal A., et al. The *Bacillus anthracis* chromosome contains four conserved, excision proficient, putative prophages // BMC Microbiol. — 2006. — Vol. 6. — Art. 34. doi: 10.1186/1471-2180-6-34.

27. Turell M.J., Knudson G.B. Mechanical transmission of *Bacillus anthracis* by stable flies (*Stomoxys calcitrans*) and mosquitoes (*Aedes aegypti* and *Aedes taeniorhynchus*) // Infect. Immun. — 1987. — Vol. 55. — No. 8. — P. 1859–1861.
28. Turnbull P.C., Lindeque P.M., Le Roux J., Bennett A.M., Parks S.R. Airborne movement of anthrax spores from carcass sites in the Etosha National Park, Namibia // J. Appl. Microbiol. — 1998. — Vol. 84. — P. 667–676.
29. Turnbull P.C.B., Carman J.A., Lindeque P.M., Joubert F., Hubschle O.J.B., et al. Further progress in understanding Anthrax in the Etosha National Park. Madoqua. — 1989. — Vol. 16. — P. 93–104.
30. Turnbull P.C.B. Guidance on environments known to be or suspected of being contaminated with anthrax spores // Land contamination and reclamation. — 1964. — Vol. 4. — P. 37–45.
31. Turnbull P.C. Introduction: anthrax history, disease and ecology // Curr. Top. Microbiol. Immunol. — 2002. — Vol. 271. — P. 1–19. doi: 10.1007/978-3-662-05767-4_1.
32. Turner W.C., Kausrud K.L., Beyer W., Easterday W.R., Barandongo Z.R., Blaschke E., Cloete C.C., Lazak J., Van Ert M.N., Ganz H.H. Lethal exposure: an integrated approach to pathogen transmission via environmental reservoirs // Sci. Rep. — 2016. — Vol. 6. — Art. 27311. doi: 10.1038/srep27311.
33. Valseth K., Nesbø C.L., Easterday W.R., Turner W.C., Olsen J.S., Stenseth N.C., Haverkamp T.A. Temporal dynamics in microbial soil communities at anthrax carcass sites // BMC Microbiol. — 2017. — Vol. 17. — No. 1. — Art. 206. doi: 10.1186/s12866-017-1111-6.
34. Van Ness G.B. Ecology of anthrax // Science. — 1971. — Vol. 172. — P. 1303–1307.
35. Vilas-Boas G.T., Peruca A.P., Arantes O.M. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis* // Can. J. Microbiol. — 2007. — Vol. 53. — P. 673–687.
36. Williams G., Linley E., Nicholas R., Baillie L. The role of the exosporium in the environmental distribution of anthrax // J. Appl. Microbiol. — 2013. — Vol. 114. — No. 2. — P. 396–403.
37. Zhou J., Deng Y., Luo F., He Z., Tu Q., Zhi X. Functional molecular ecological networks // mBio. — 2010. — Vol. 1. — No. 4. — e00169-10. doi: 10.1128/mBio.00169-10.
3. Tsygankova OI, Yeremenko YeI, Tsygankova YeA, Buravtseva NP, Ryazanova AG. Fenotipicheskiye i geneticheskiye osobennosti kul'tural'no-morfologicheskikh variantov *Bacillus anthracis*. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 2008; 4:6–11 (in Russian).
4. Yamtitina MN, Makarov VV. Ekologiya sibirskoy yazvy / Zh «Trudy federal'nogo tsentra okhrany zdorov'ya zhivotnykh» 2018; 16:44–53 (in Russian).
5. Beeton ML, Atkinson DJ, Waterfield NR. An amoeba phagocytosis model reveals a novel developmental switch in the insect pathogen *Bacillus thuringiensis*. J Insect Physiol 2013; 59(2):223–231.
6. Braun P, Grass G, Aceti A, Serrecchia L, Affuso A, Marino L, Grimaldi S, Pagano S, Hanczaruk M, Georgi E, Northoff B, Schöler A, Schloter M, Antwerpen M, Fasanella A. Microevolution of anthrax from a young ancestor (MAYA) suggests a soil-borne life cycle of *Bacillus anthracis*. PLoS One 2015; 10(8):e0135346. doi: 10.1371/journal.pone.0135346.
7. Brussow H, Can Chaya C, Hardt WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. Microbiol Mol Biol Rev 2004; 68(3):560–602.
8. Connor N, Sikorski J, Rooney AP, Kopac S, Koeppl AF, Burger A, Cole SG, Perry EB, Krizanc D, Field NC, Slaton M, Cohan FM. Ecology of speciation in the genus *Bacillus*. Appl Environ Microbiol 2010; 76(5):1349–1358.
9. Dey R, Hoffman PS, Glomski IJ. Germination and amplification of anthrax spores by soil-dwelling amoebas. Appl Environ Microbiol 2012; 78(22):8075–8081.
10. Dragon DC, Bader DE, Mitchell J, Woollen N. Natural dissemination of *Bacillus anthracis* spores in northern Canada. Appl Environ Microbiol 2005; 71(3):1610–1615.
11. Dragon DC, Rennie RP. The ecology of anthrax spores: tough but not invincible. Canadian Veterinary Journal 1995; 36:295–301.
12. Fasanella A, Galante D, Garofolo G, Jones MH. Anthrax undervalued zoonosis. Veterinary Microbiology 2010; 140(3–4):318–331.
13. Ganz HH, Turner WC, Brodie EL, Kusters M, Shi Y, Sibanda H, Torok T, Getz WM. Interactions between *Bacillus anthracis* and plants may promote anthrax transmission. PLoS Negl Trop Dis 2014; 8(6):e2903. doi: 10.1371/journal.pntd.0002903.
14. Hugh-Jones M, Blackburn J. The ecology of *Bacillus anthracis*. Mol Aspects Med 2009; 30(6):356–367.
15. Ivanova N, Sorokin A, Anderson I, Galleron N, Candelon B, et al. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. Nature 2003; 423:87–91.
16. Lee K, Costerton JW, Ravel J, Auerbach RK, Wagner DM, et al. Phenotypic and functional characterization of *Bacillus anthracis* biofilms. Microbiology 2007; 153:1693–1701.
17. Lindeque PM, Turnbull PC. Ecology and epidemiology of anthrax in the Etosha National Park, Namibia. Onderstepoort J Vet Res 1994; 61(1):71–83.

References

1. Makarov VV, Briko NI. Mirovoy nozoareal sibirskoy yazvy. Epidemiologiya i infektsionnyye bolezni. Aktual'nyye voprosy 2011; 2:13–18 (in Russian).
2. Onishchenko GG, Vasil'yev NG, Litusov NV, Kharechko AT, Vasil'yev PG, Sadovoy NV, Kozhukhov VV. Sibirskaya yazva: aktual'nyye aspekty mikrobiologii, epidemiologii, kliniki, diagnostiki, lecheniya i profilaktiki. — M.: VUNMTS MZ RF, 1999: 448 (in Russian).

18. Majed R, Faille C, Kallassy M, Gohar M. *Bacillus cereus* biofilms — same, only different. *Front Microbiol* 2016; 7:1054. doi: 10.3389/fmicb.2016.01054.
19. Mignot T, Mock M, Robichon D, Landier A, Lereclus D, et al. The incompatibility between the PlcR- and AtxA-controlled regulons may have selected a nonsense mutation in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* 2001; 4(2):1189–1198.
20. Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P. Resistance of *Bacillus endospores* to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64:548–572.
21. Pflughoft KJ, Sumbly P, Koehler TM. *Bacillus anthracis* sin locus and regulation of secreted proteases. *J Bacteriol* 2011; 193(3):631–639.
22. Rasko DA, Altherr MR, Han CS, Ravel J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol Rev* 2005; 29:303–329.
23. Read TD, Peterson SN, Tourasse N, Baillie LW, Paulsen IT, et al. The genome sequence of *Bacillus anthracis*. Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature* 2003; 423:81–86.
24. Saile E, Koehler TM. *Bacillus anthracis* multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:3168–3174.
25. Schuch R, Fischetti VA. The secret life of the anthrax agent *Bacillus anthracis*: bacteriophage-mediated ecological adaptations. *PLoS One* 2009; 4(8):e6532. doi: 10.1371/journal.pone.0006532.
26. Sozhamannan S, Chute MD, Mc Afee FD, Fouts DE, Akmal A, et al. The *Bacillus anthracis* chromosome contains four conserved, excision proficient, putative prophages. *BMC Microbiol* 2006; 6:34. doi: 10.1186/1471-2180-6-34.
27. Turell MJ, Knudson GB. Mechanical transmission of *Bacillus anthracis* by stable flies (*Stomoxys calcitrans*) and mosquitoes (*Aedes aegypti* and *Aedes taeniorhynchus*). *Infect Immun* 1987; 55(8):1859–1861.
28. Turnbull PC, Lindeque PM, Le Roux J, Bennett AM, Parks SR. Airborne movement of anthrax spores from carcass sites in the Etosha National Park, Namibia. *J Appl Microbiol* 1998; 84:667–676.
29. Turnbull PCB, Carman JA, Lindeque PM, Joubert F, Hubschle OJB, et al. Further progress in understanding Anthrax in the Etosha National Park. *Madoqua* 1989; 16:93–104.
30. Turnbull PCB. Guidance on environments known to be or suspected of being contaminated with anthrax spores. *Land contamination and reclamation* 1964; 4:37–45.
31. Turnbull PC. Introduction: anthrax history, disease and ecology. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 271:1–19. doi: 10.1007/978-3-662-05767-4_1.
32. Turner WC, Kausrud KL, Beyer W, Easterday WR, Barandongo ZR, Blaschke E, Cloete CC, Lazak J, Van Ert MN, Ganz HH. Lethal exposure: an integrated approach to pathogen transmission via environmental reservoirs. *Sci Rep* 2016; 6:27311. doi: 10.1038/srep27311.
33. Valseth K, Nesbø CL, Easterday WR, Turner WC, Olsen JS, Stenseth NC, Haverkamp TA. Temporal dynamics in microbial soil communities at anthrax carcass sites. *BMC Microbiol* 2017; 17(1):206. doi: 10.1186/s12866-017-1111-6.
34. Van Ness GB. Ecology of anthrax. *Science* 1971; 172:1303–1307.
35. Vilas-Boas GT, Peruca AP, Arantes OM. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol* 2007; 53:673–687.
36. Williams G, Linley E, Nicholas R, Baillie L. The role of the exosporium in the environmental distribution of anthrax. *J Appl Microbiol* 2013; 114(2):396–403.
37. Zhou J, Deng Y, Luo F, He Z, Tu Q, Zhi X. Functional molecular ecological networks. *mBio* 2010; 1(4):e00169-10. doi: 10.1128/mBio.00169-10.

FEATURES OF THE SOIL PHASE OF THE EXISTENCE OF *BACILLUS ANTHRACIS*

A.V. KALININ, E.A. KOTENEVA, O.I. TSYGANKOVA, A.V. ABRAMOVICH

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol

The causative agent of anthrax, *Bacillus anthracis*, has adaptation mechanisms to exist in different conditions: in the body of mammals and in the environment (soil). The short phase of existence in the body of sensitive animals is subordinated to the goal of rapid and productive reproduction, regardless of the outcome of the animal's disease. Considering the duration of the «soil» phase of the existence of *B. anthracis* and its importance in the formation of the infection reservoir, the need to study all the factors and processes that affect the anthrax microbe in this complex and multifactorial ecological system is obvious. The authors examined various strategies for the survival of the anthrax pathogen in the soil environment, such as locus development at the time of the most favorable conditions in the soil, existence in the form of a plant rhizosphere biofilm, colonization of the intestines of worms and insects, and predation on soil amoebae. Understanding how the anthrax microbe persists in soil systems and interacts with its inhabitants will contribute to a

better understanding of the epidemiology and ecology of *B. anthracis* and the assessment of these phenomena for the formation and maintenance of persistent soil foci of anthrax infection.

Keywords: *Bacillus anthracis*, soil, life cycle, plasmids, sporulation, adaptation.

Address:

Koteneva E.A., Ph.D.

Head of the laboratory of postgenomic technologies,

Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

E-mail: postgenom_stv@mail.ru

Для цитирования:

Калинин А.В., Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Абрамович А.В. Особенности почвенной фазы существования *Bacillus anthracis*. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2024; 20(1): 82–89.

For citation:

Kalinin A.V., Koteneva E.A., Tsygankova O.I., Abramovich A.V. Features of the soil phase of the existence of *Bacillus anthracis*. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2024; 20(1):82–89 (in Russian).

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2024 ГОДА

СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

1859 – 165 лет со дня публикации книги Дарвина «Происхождение видов путем естественного отбора».

1864 – сформулирован биогенетический закон (закон Геккеля – Мюллера).

1869 – 155 лет открытия периодического закона Д.И. Менделеева.

1869 – И.Ф. Мишер выделил из лейкоцитов вещество нуклеин, содержащее ДНК.

1874 – открыт митоз у растительных клеток (И.Д. Чистяков).

1884 – 140 лет создания Пастером вакцины против бешенства.

1889 – получены чистые нуклеиновые кислоты (Р. Альтман).

1894 – создана антидифтерийная сыворотка (Э. Ру, Э. Беринг).

1899 – 125 лет: открытие бактериофагов (Н.Ф. Гамалея).

1909 – 115 лет: введение термина «ген» (В. Йогансен, 1857–1927).

1929 – Александер Флеминг опубликовал свою ставшую знаменитой статью об открытии пенициллина в журнале «British Journal of Experimental Pathology, 1929, Vol. 10, P. 226–236».

1929 – открытие дезоксирибозы (Ф. Левин).

1939 – 85 лет: создание первого просвечивающего электронного микроскопа (Сименс).

1939 – установлена химическая структура витамина К (Э. Дойзи).

1944 – 80 лет: применение Ф. Сенгером метода хроматографии для определения аминокислотной последовательности инсулина.

1944 – выход в свет книги австрийского физика Эрвина Шредингера «What is life?» («Что такое жизнь с точки зрения физики?») (Перевод на русский язык был вскоре осуществлен известным биологом А.А. Малиновским (1947). За один год до ее официального запрещения в СССР с ней успели ознакомиться специалисты. Книга эта впоследствии привела в биологию многих представителей точных наук.

1944 – доказательство генетической роли ДНК (О. Эйвери, С. Маклеод, М. Маккарти).

1944 – открытие транспозируемых генетических элементов Барбарой Мак-Клинтон (Нобелевская премия 1983 г.).

1954 – сформулирована идея триплетного генетического кода (Г.А. Гамов).

1959 – 65 лет: присуждение Нобелевской премии С. Очоа и А. Корнбергу.

1959 – введение в лабораторную практику полиакриламидного геля (С. Рэймонд).

1961 – французские ученые Ф. Жакоб и Ж. Моно открыли механизм регуляции генетического кода. Выдвинули концепцию оперона и предложили соответствующую терминологию. Удостоены Нобелевской премии вместе с А.М. Львовым (1965).

1964 – открыты транспозирующие генетические элементы – транспозоны – микроорганизмов: Э. Кондо, С. Митсухаши.

1969 – 55 лет: выход в свет на русском языке книги Дж. Уотсона «Двойная спираль» (английский оригинал был опубликован в 1968 г.). Книга эта была переведена на 20 языков и вышла тиражом более 1 миллиона экземпляров. Это фактически книга века.

1969 – 55 лет: химический синтез искусственного гена, кодирующего аланиновую тРНК дрожжей (Х.Г. Корана).

1969 – Г. Темин зафиксировал у ретровирусов обратную транскрипцию.

1969 — изобретена ДНК-ДНК- и РНК-ДНК-гибридизация.

1974 — 50 лет: разработка Фредериком Сенгером метода секвенирования ДНК.

1974 — пересадка гена рибосомной РНК лягушки в бактериальную клетку. Начало генной инженерии (С. Коэн, Г. Бойер).

1974 — Рудольф Йениш создал первое трансгенное млекопитающее.

1979 — 45 лет: разработка метода клонирования ДНК, позволяющего выделять и клонировать тысячи различных генов (Bender W.W., Hogness D.S.).

1984 — 40 лет: разработка метода генетических «отпечатков пальцев» — «DNA fingerprinting technique» (Аlec Jeffreys).

1984 — вручение Нобелевской премии Г. Кёлеру и С. Мильштейну за получение моноклональных антител.

1989 — 35 лет: создание в США Национального центра по исследованию генома человека во главе с лауреатом Нобелевской премии Джеймсом Уотсоном.

1999 — 25 лет: расшифровка генома дрозофилы.

2004 — 20 лет: расшифровка генома крысы.

2014 — получена бактерия с расширенным генетическим кодом.

ПЕРСОНАЛИИ

190 лет со дня рождения Д.И. Менделеева (1834–1907).

175 лет со дня рождения Иохана Густава Кьельдаля (1849–1900). Автор известного метода определения количества белка и азотсодержащих соединений в тканях и жидкостях организма (метод Кьельдаля, 1883).

175 лет со дня рождения Уильяма Ослера (1849–1919), канадского терапевта, человека энциклопедических знаний. В числе других заболеваний описал синдром наследственной телеангиэктазии — болезнь Ослера — Рандю (1901).

130 лет со дня рождения Льва Александровича Зильбера (1894–1966), отечественного вирусолога.

130 лет со дня рождения Владимира Александровича Энгельгардта (1894–1984), отечественного биохимика.

125 лет со дня рождения Александра Николаевича Несмеянова (1899–1980), отечественного химика-органика, президента АН СССР (1951–1961).

125 лет со дня рождения Альбера Клода (1899–1983), бельгийского цитолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1974, вместе с Дж. Паладе и К. де Дювом) за исследования по структурной и функциональной организации клетки.

125 лет со дня рождения Макфарлейна Франка Бернета (1899–1985), австралийского иммунолога и вирусолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1960, совместно с П. Медавара) за открытие искусственной иммунологической толерантности.

120 лет со дня рождения Александра Александровича Баева (1904–1994), российского биохимика.

120 лет со дня рождения Глеба Михайловича Франка (1904–1976), российского биофизика.

110 лет со дня рождения Ренато Дульбекко (1914–2012), американского вирусолога итальянского происхождения, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1975 года (совместно с Д. Балтимором и Х. Теминьим).

90 лет со дня рождения Хоуарда Мартина Темина (1934–1994), американского вирусолога и генетика, лауреата Нобелевской премии. Является автором теории провируса (переноса генетической информации с РНК на ДНК и первооткрывателем обратной транскрипции (одновременно и независимо от Д. Балтимора).

90 лет со дня рождения Юрия Анатольевича Овчинникова (1934–1988), российского молекулярного биолога и специалиста в области физико-химической биологии, вице-президента АН СССР (1974–1988). Является основоположником отечественной биоорганической химии и биотехнологии.

К 90-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова*



В этом году исполняется 90 лет со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова. Он рано ушел из жизни, не осуществив многих намеченных им планов.

Наш журнал, носящий его имя, достаточно освещал факты его жизни и анализировал итоги его многогранной деятельности.

Что хочется еще сказать, особенно в исторической ретроспективе? Наверное, наиболее уместно сделать акцент на неслучайности появления и объективной детерминированности такой яркой, необычайной личности. Во всяком случае, трудно себе представить, кто бы лучше, адекватнее и профессиональнее мог выполнить миссию кардинального преобразования и ликвидации последствий ущерба, нанесенного отечественной биологии многолетним «экспериментом» по прививке антинауки и антиобразования в данной области знаний в великой стране Д.И. Менделеева, И.П. Павлова, Н.К. Кольцова.

Ю.А. Овчинников в течение двух десятилетий занимал один из высоких постов в организационной структуре государственного уровня, призванной восстановить в максимально возможные краткие сроки нормальные, цивилизованные условия для возобновления научной, педагогической и практической работы в биологии и сопряженных сферах. И нужно сказать, что он с честью выполнил эту грандиозную задачу.

Все это стало возможным благодаря выдающимся качествам личности Юрия Анатольевича. Здесь еще

сказывался и эффект его физического присутствия. Он хорошо знал свои достоинства и умело использовал их в любой аудитории. Его голос уверенно звучал в своей профессиональной и особенно академической среде. Он был ясен и понятен врачам, инженерам, педагогам и т.д. Любил он общаться с молодежью, в том числе со студентами и школьниками, хорошо понимая, что именно им предстоит исправлять ошибки прошлого и строить новое.

Обращает на себя внимание то, что Ю.А. Овчинников проявлял себя везде в самых превосходных степенях. После восстановления надолго прерванных дипломатических отношений с Испанией именно ему доверили руководство обществом «СССР-Испания», и он великолепно справился с этой задачей, общаясь с лицами высшего уровня, включая короля Испании Хуана Карлоса.

Конечно, существенным вкладом Ю.А. Овчинникова в развитие биологических исследований была организация сети специализированных научных учреждений в области биоорганической химии в масштабах всей страны. Они стали центрами, объединившими современные молекулярно-биологические подходы: Владивосток, Новосибирск, Минск, Ташкент и др. Независимо от политических и социальных условий эти учреждения, организованные в основном в 1970-е годы, сохранили свои научные направления и продуктивность.

Все это было создано на евроазиатском пространстве. Идеи Ю.А. Овчинникова оказались жизнеспособными, уже сыграли определенную роль и в принципе обещают принести еще более значимые результаты. Особенно важно это действие в отношении Дальнего Востока — здесь точка роста вполне реальная и особенно перспективная для России.

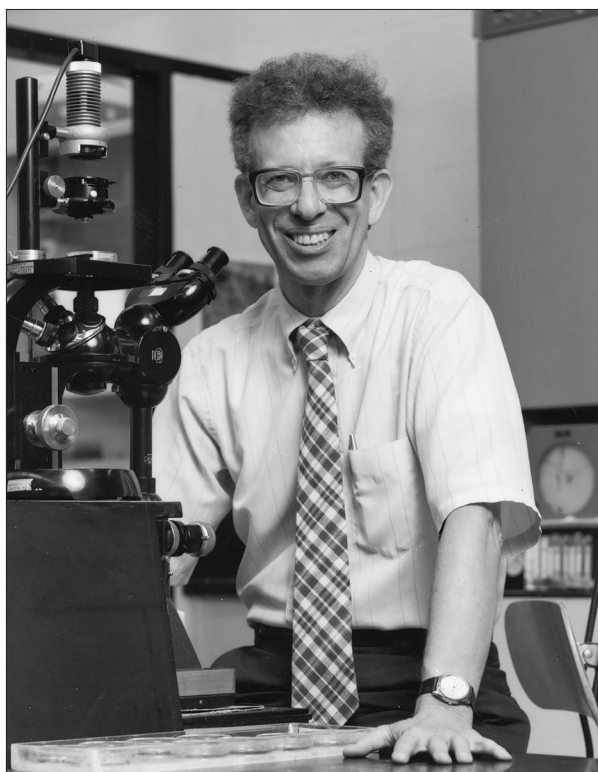
Родной институт Юрия Анатольевича (с 2021 г. — ГНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН), выстроенный в Москве как подлинный дворец науки (с филиалом в Пуцдино), его детище и очаг физико-химических и молекулярно-биологических прогрессивных начинаний, продолжает занимать лидирующие позиции в своей сфере и сохраняет о нем благодарную память. Прекрасное здание, академический статус, многолетний авторитет — все это обязательно сработает на опередившую время деятельность и мечты Юрия Анатольевича. Требуется только появление нового поколения пассионарных личностей.

Трудно перечислять конкретные направления его деятельности. Они были многовекторны и поливалентны.

* Материал подготовлен Воробьевым В.С.

У нас принято говорить о появлении таких общественных фигур в нужное время и в нужном месте. Юрий Анатольевич был именно таким, и это — не формальная фраза, а действительность. Вечная ему память.

**К 90-летию со дня рождения
Хоурда Мартина Темина (1934–1994)***



Американский вирусолог и генетик Х.М. Темин является знаковой фигурой в истории молекулярной биологии. Он прожил недолгую жизнь (умер от рака легких в 59 лет), но сделанное им в науке имеет непреходящую ценность. Является автором теории провируса (переноса генетической информации с РНК на ДНК и первооткрывателем обратной транскрипции (одновременно и независимо от Д. Балтимора).

Нужно подчеркнуть, что обнаруженная им обратная транскриптаза представляет собой ключевой фермент при таком заболевании, как СПИД. Этот фермент служит важным компонентом метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Х.М. Темин родился в 1934 году в Филадельфии. Учась в средней школе, он получил дополнительное образование по летней студенческой программе, где проявил интерес к науке. В 1955 году ему присудили степень бакалавра в колледже Суотмор по специальности «Биоло-

гия». Степени доктора в области вирусологии животных он был удостоен в Калифорнийском технологическом институте в 1960 году. Тема диссертации — «Взаимодействие вируса саркомы Рауса и клеток *in vitro*».

В Калифорнийском технологическом институте он был аспирантом в лаборатории известного профессора Ренато Дульбекко. Это тоже оказалось судьбоносным для него. Здесь он полностью переключился на вирусологию животных. После получения докторской степени он продолжил трудиться в лаборатории Дульбекко в качестве постдока.

В 1960 году его приняли на работу в должности вирусолога в лабораторию исследований рака Макардла в Университете Висконсин–Мэдисон. Через некоторое время ему предоставили собственную лабораторию в Мэдисоне с присвоением звания доцента. При этом была сохранена тематика исследования вируса саркомы Рауса — ретровируса, являющегося первым описанным онковирусом.

Указанная концентрация внимания постепенно дала эффект. Генетический материал, который вирус вводит в клетки, он назвал «провирусом». Применяя антибиотик актиномицин D для подавления экспрессии ДНК, Темин установил, что провирус является ДНК или же находится на ДНК клетки. Таким образом, из экспериментов следовало, что РНК-содержащий вирус саркомы Рауса генерирует комплементарную двухцепочечную ДНК. А это уже означало, что опухолевые вирусы влияют на генетический материал клетки с помощью обратной транскрипции, то есть противоречило господствовавшей тогда «Центральной догме» молекулярной биологии, развиваемой авторитетным Фрэнсисом Криком, лауреатом Нобелевской премии и соавтором «открытия века» — расшифровки строения ДНК.

Мнение Крика возобладало в научном мире, и факт, констатированный Теминым, был проигнорирован. Однако Темина это не смутило, и он продолжал поиски доказательства справедливости своей идеи. В 1969 году он продемонстрировал, что некоторые опухолевые вирусы обладают ферментативной способностью передавать информацию от РНК к ДНК посредством обратной транскриптазы. Параллельно и независимо от него данный фермент был открыт Дэвидом Балтимором в связи с вирусом лейкоза мышей. Этот феноменальный прорыв в человеческих знаниях был немедленно отмечен Нобелевской премией по физиологии и медицине в 1975 году за «открытия, касающиеся взаимодействия между онкогенными вирусами и генетическим материалом клет-

* Материал подготовлен Воробьевым В.С.

ки» (ее вручили Ренато Дульбекко, Хоуарду Мартину Темину, Дэвиду Балтимору).

Безусловно, последовали и другие награды. Темин был избран членом Американской академии искусств и наук (1973), Национальной академии наук США (1974) и Американского философского общества (1978). Он был удостоен награды Пфайзера в области химии ферментов (1973), премии Альберта Ласкера за фундаментальные медицинские исследования (1974), Международной премии Гайрднера (1974). Темин был также избран в 1988 г. иностранным членом Королевского общества.

В последующие годы научные интересы Х.М. Темина были обращены на изучение вирусных последова-

тельностью, контролирующих упаковку вирусной РНК, разработку новой вакцины против ВИЧ и изучение механизмов ретровирусной изменчивости. Он был связан с более чем 14 научными журналами.

Громкое имя ученого обрело и широкую общественную активность. В 1979 году он стал членом-консультантом директора Национального института здравоохранения. Он состоял членом Национального консультативного совета по борьбе с раком и председателем подкомитета по СПИДу. Был также членом разных комитетов и групп. Последним комитетом, в котором он работал, был Консультативный совет Всемирной организации здравоохранения. В 1981 году Темин стал одним из основателей Всемирного совета по культуре.

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

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

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



Подписано к печати 07.04.2024
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 6,0. Тираж 1000 экз.

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