

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Васильов

Заместитель главного редактора

Т.Н. Гаева

Редакционная коллегия

Р.Г. Васильов, Т.Н. Гаева, А.А. Назаренко, И.С. Фадеева

Редакционный совет

Ш.О. Бастуабаева (Алмаатинская обл., Республика Казахстан), В.С. Акатов (Пушино),
М.В. Донова (Пушино), 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), 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 Т.В. Смирнова
Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3
Тел.: +7 (495) 648-09-13
E-mail: vestnik@biorosinfo.ru

Учредитель и издатель:
АНО «Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем»
Адрес: 123060, г. Москва, а/я 6
E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке
Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

2026, Vol. 22, 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

Deputy chief editor

T.N. Gaeva

Editorial board

R.G. Vasilov, T.N. Gaeva, A.A. Nazarenko, I.S. Fadeeva

Editorial council

Sh.O. Bastuabayeva (Alma-Ata region, Republic of Kazakhstan), V.S. Akatov (Pushchino),
M.V. Donova (Pushchino), 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), 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 of the Editorial Office T.V. Smirnova
Address: 123060, Moscow, PO Box 3
Tel.: +7 (495) 648-09-13
E-mail: vestnik@biorosinfo.ru

Founder and Publisher:
ANO «Information and Analytical Center
for Medical and Social Problems»
Address: 123060, Moscow, PO Box 6
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, 2026

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. Р.Г. Васильев 5

Оригинальные статьи

- Иммунохимический анализ рекомбинантных антигенов чумного микроба и оценка протективного потенциала их совместного применения.
А.А. Буданова, А.Ю. Гончарова, С.А. Бугоркова 7
- Некодирующие РНК как потенциальные мишени белка *EsCSDP3* растения *Eutrema salsugineum* (Pall.).
А.О. Шамустакимова, А.А. Соловьёв 15
- Осмоляльность как критический параметр качества и безопасности антирабического иммуноглобулина.
*А.А. Савенкова, С.В. Генералов, Ю.А. Фомина, Е.Г. Абрамова,
И.В. Шульгина, О.А. Лобовикова, А.Г. Селезнева, А.К. Никифоров* 26
- Литические свойства бактериофагов *Enterobacter* spp. В отношении возбудителей бактериальных инфекций, циркулирующих на территориях России и Вьетнам.
Л.В. Катаева, А.А. Вакарина, Н.Ф. Карпущина, О.В. Посоюзных, К.Б. Степанова 35
- Эмульгирующая способность полисахаридов некоторых грибов и бактерий.
*О.О. Бабичева, И.М. Абраменко, Г.Е. Рысмухамбетова, Н.В. Кичемазова,
Г.Т. Урядова, Л.В. Карпущина* 43
- Интенсификация производства диагностических иммунобиологических препаратов.
*А.В. Комиссаров, М.В. Овчинникова, О.А. Лобовикова, С.А. Бадарин,
Д.Н. Бибилов, Н.В. Синецкая, Е.А. Глазкова, Г.Н. Гиненко, А.К. Никифоров* 52
- Микробиологические и молекулярно-генетические аспекты антибиотикорезистентности штаммов *Vibrio parahaemolyticus*.
*М.М. Сагакянц, О.А. Подойницына, В.В. Агафонова, О.А. Цырулина,
М.В. Полева, В.А. Лычман, А.Ю. Карнаухов* 61
- Иммобилизация микроводорослей в гидрогелевые сфероиды с использованием подходов микрофлюидики.
А.Л. Спиридонова, Д.С. Владимиров, И.А. Черенков 71
- Разработка этапов получения холерных бактериофагов для включения в состав профилактического препарата.
*А.В. Тюрина, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова, В.В. Евдокимова,
О.А. Якушева, Ю.В. Сизова, А.О. Аноприенко, О.А. Богдан* 80
- Исследование эффективности применения дрожжей «Кодзи» для получения спирта из риса.
К.Р. Алиев, Н.А. Кабанова, Н.А. Тиникашвили, Н.Ф. Бирагова, Р.К. Алиев 88

Обзоры

- Возможность использования бактериофагов для дезинфекции.
Ю.В. Сизова, А.В. Тюрина, М.П. Погожова, Н.Е. Гаевская 94
- Развитие медицинского применения натурального шёлка: от традиционных практик к современной клинике.
Е.И. Подболотова, И.И. Агапов 104
- Нуклеотидные замены в гене лактоферрина и их характеристики.
А. Диабате, С.Н. Марзанова, В.А. Жучков 115

Правила для авторов 127

CONTENTS

Column of the Chief editor

To readers. R.G. Vasilov 5

Original articles

Immunochemical analysis of recombinant antigens of the plague microbe and evaluation of the protective potential of their combined use.

A.A. Budanova, A.Yu. Goncharova, S.A. Bugorkova 7

Non-coding RNAs as potential targets of the *EsCSDP3* protein from *Eutrema salsugineum* (Pall.).

A.O. Shamustakimova^{1,2}, A.A. Soloviev^{1,3} 15

Osmolality as a critical parameter of the quality and safety of antirabies immunoglobulin.

*A.A. Savenkova, S.V. Generalov, E.G. Abramova, Yu.A. Fomina, A.G. Selezneva,
I.V. Shuligina, O.A. Lobovikova, A.K. Nikiforov* 26

Lytic properties of *Enterobacter* spp. bacteriophages against bacterial infection agents circulating in Russia and Vietnam.

L.V. Kataeva, A.A. Vakarina, N.F. Karpukhina, O.V. Posoyuznykh, K.B. Stepanova 35

Emulsifying ability of polysaccharides of some fungi and bacteria.

*O.O. Babicheva, I.M. Abramenko, G.E. Rysmukhambetova, N.V. Kichemazova,
G.T. Uryadova, L.V. Karpunina* 43

Intensification of production of diagnostic immunobio-logical preparations.

*A.V. Komisarov, M.V. Ovchinnikova, O.A. Lobovikova, S.A. Badarin, D.N. Bibikov, N.V. Sinitsyna,
E.A. Glazkova, G.N. Ginenko, A.K. Nikiforov* 52

Microbiological and molecular genetic aspects of antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* strains.

*M.M. Sagakyants, O.A. Podoinitsyna, V.V. Agafonova, O.A. Cyrulina,
M.V. Poleeva, V.V. Lychman, A.Yu. Karnaukhov* 61

Immobilisation of microalgae in hydrogel spheroids using microfluidic techniques.

A.L. Spiridonova, D.S. Vladimirov, I.A. Cherenkov 71

Development of stages for obtaining holera bacteriophages for inclusion in the composition of a preventive drug.

*A.V. Tyurina, N.E. Gaevskaya, M.P. Pogozhova, V.V. Evdokimova, O.A. Yakusheva,
Yu.V. Sizova, A.O. Anoprienko, O.A. Bogdan* 80

A study on the effectiveness of «Koji» yeast for producing alcohol from rice.

K.R. Aliev, N.A. Kabanova, N.A. Tinikashvili, N.F. Biragova, R.K. Aliyev 88

Reviews

The possibility of using bacteriophages for disinfection.

Yu.V. Sizova, A.V. Tyurina, M.P. Pogozhova, N.E. Gaevskaya 94

Development of the medical application of natural silk: from traditional practices to modern clinical use.

E.I. Podbolotova, I.I. Agapov 104

Nucleotide substitutions in the lactoferrin gene and their characteristics.

A. Diabate, S.N. Marzanova, V.A. Zhuchkov 115

Rules for authors 127

К читателям

В номере 1 за 2026 год представлены оригинальные исследования и обзоры, отражающие современные тенденции развития биотехнологии, медицинской микробиологии, биоматериалов и агро-биотехнологий.

Работа А.А. Будановой и соавт. (Российский противочумный институт «Микроб») посвящена комплексной иммунобиологической характеристике рекомбинантных антигенов возбудителя чумы и оценке их эффективности в качестве бустирующего компонента живой чумной вакцины, что демонстрирует перспективность сочетания белковых антигенов с иммуномодуляторами для повышения специфической защиты.

А.О. Шамустакимова и А.А. Соловьёв (ВНИИСБ, ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса», ВНИИКР) исследуют РНК-интерактом белка *EsCSDP3* растения *Eutrema salsugineum* у закалённых и незакалённых растений *Arabidopsis thaliana*, выявляя широкий спектр некодирующих РНК-мишеней и функциональные связи в регуляции ответов на холодовой стресс.

Исследование А.А. Савенковой и соавт. (Российский противочумный институт «Микроб», «Вавиловский университет», СГМУ им. В.И. Разумовского) обосновывает включение показателя осмоляльности в систему контроля качества антирабического иммуноглобулина как критического параметра, влияющего на безопасность и переносимость препарата и снижающего риск постинъекционных реакций.

Л.В. Катаева и коллеги (ТНИИКИП Роспотребнадзора) оценивают литические свойства экспериментальных серий бактериофагов *Enterobacter* spp. в отношении клинических и экологических штаммов из России и Вьетнама, выделяя фаги с высоким уровнем активности и широким спектром действия, перспективные для создания диагностических, профилактических и лечебных препаратов.

Работа О.О. Бабичевой и соавт. («Вавиловский университет», СГМУ им. В.И. Разумовского) демонстрирует высокую эмульгирующую активность полисахаридов ряда грибов и бактерий в системах с различными маслами и органическими растворителями, показывая их потенциал как экологически безопасной альтернативы синтетическим эмульгаторам.

А.В. Комиссаров и соавт. (Российский противочумный институт «Микроб») разрабатывают и внедряют методические подходы к герметизации лиофилизированных диагностических препаратов в атмосфере инертного газа, обосновывая критерии герметичности и остаточного кислорода и демонстрируя кратный рост производительности при сохранении стабильного качества препаратов.

Исследование М.М. Сагакянц и коллег (Ростовский-на-Дону противочумный институт) посвящено микробиологическим и молекулярно-генетическим аспектам антибиотикорезистентности *Vibrio parahaemolyticus*, где показано широкое распространение генов β -лактамаз и других детерминант устойчивости, а также различия в частоте множественной резистентности между клиническими и экологическими штаммами.

А.Л. Спиридонова и соавт. (Удмуртский государственный университет, ООО «Технологии микрофлюидной инкапсуляции») моделируют и создают микрофлюидный генератор гидрогелевых капель для иммобилизации микроводорослей, оптимизируя параметры течения и демонстрируя стабильное формирование сфероидов с равномерным распределением клеток *Scenedesmus quadricauda*.

Работа А.В. Тюриной и коллег (Ростовский-на-Дону противочумный институт) описывает разработку методического подхода к получению холерных бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1 для профилактического препарата, включая оптимизацию условий культивирования и многоступенчатую очистку, что позволяет увеличить выход фаговых частиц и обеспечить минимальное содержание бактериальных токсинов.

К.Р. Алиев и соавт. (Северо-Кавказский горно-металлургический институт) впервые исследуют эффективность дрожжей «Кодзи» для получения этилового спирта из различных сортов риса, показывая возможность частичного или полного исключения традиционных этапов осахаривания и тем самым упрощения и интенсификации технологии спиртового брожения.

В обзоре Ю.В. Сизовой и соавт. (Ростовский-на-Дону противочумный институт) систематизированы данные о применении бактериофагов для биологической дезинфекции поверхностей и водных объектов, обсуждаются схемы использования фагов как самостоятельно, так и в сочетании с другими агентами, а также перспективы внедрения фаговых препаратов в практику борьбы с устойчивыми патогенами.

Е.И. Подболотова и И.И. Агапов (НМИЦ ТИО им. акад. В.И. Шумакова) прослеживают эволюцию медицинского использования натурального шёлка от традиционных практик до современной клиники, анализируя

его физико-химические свойства, биосовместимость и текущие клинические ниши, где шёлк остаётся востребованным биоматериалом.

Обзор А. Диабате и соавт. (МВА им. К.И. Скрыбина) обобщает данные о нуклеотидных заменах в гене лактоферрина крупного рогатого скота, их влиянии на структуру белка, антимикробную активность и экспрессию, а также обсуждает потенциал LTF как селекционного маркера для повышения продуктивности, качества молока и резистентности животных.

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

ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ ЧУМНОГО МИКРОБА И ОЦЕНКА ПРОТЕКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА ИХ СОВМЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

А.А. БУДАНОВА*, А.Ю. ГОНЧАРОВА, С.А. БУГОРКОВА

ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

В соответствии с определенным экспертной группой ВОЗ целевым профилем разрабатываемых вакцин против чумы основное внимание исследователей обращено к конструированию субъединичных препаратов, основные компоненты которых могут быть детально охарактеризованы и изучены по механизму действия. Тем не менее, субъединичные вакцины, в силу своей неспособности запускать эффективный клеточно-опосредованный иммунный ответ, нуждаются в дополнительном включении иммуномодулирующих компонентов или применению схем прайм-бустерной вакцинации. Цель данной работы — комплексная иммунобиологическая характеристика рекомбинантных антигенов чумного микроба и оценка эффективности их применения в качестве бустерного компонента живой чумной вакцины на модели бубонной чумы. Определены уровни продукции рекомбинантных антигенов, синтезируемых созданными ранее рекомбинантными штаммами. Установлено наличие общих эпитопов в составе белковых молекул капсульного антигена чумного микроба и его растворимой формы, обусловленных аминокислотной последовательностью (секвенциальные эпитопы), а также продемонстрирована специфичность рекомбинантного белка *Ail* к иммунной сыворотке, полученной на данный антиген. Изучены протективные свойства бустерного компонента после применения вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ на модели бубонной чумы, а также оценена возможность включения в состав антигенного комплекса для ревакцинации азоксимера бромида в качестве иммуномодулирующего препарата. Экспериментально установлено достоверное повышение средней продолжительности жизни павших животных, а также показателя выживаемости линейных белых мышей после включения в схему вакцинации бустерного компонента как в сочетании с азоксимером бромида, так и без него, что указывает на целесообразность дальнейших исследований, направленных на подбор оптимальных иммуномодулирующих препаратов и изучение механизмов их действия при сочетанном применении с белковыми антигенами для повышения эффективной специфической профилактики чумы.

Ключевые слова: чума; живая чумная вакцина; субъединичные вакцины; *F1*; *Ail*; иммуномодулятор; протективность; выживаемость.

Введение

Сохранение напряженной эпидемиологической ситуации по чуме [5] в совокупности с широким распространением природных очагов этой инфекции, а также возрастающим уровнем миграции населения, определяет целесообразность совершенствования существующих подходов, направленных на повышение эффективности специфической профилактики болезни, что невозможно без улучшения характеристик существующих противочумных вакцин, а также разработки новых, эффективных и современных средств и схем их применения.

Согласно позиции ВОЗ при конструировании чумных вакцин предпочтение отдается препаратам нового поколения, соответствующим по безопасности основным стандартам, предъявляемым ВОЗ в отношении любых вакцин [11]. Преобладающее число работ направлено на создание субъединичных чумных вакцин, основными компонентами которых являются хорошо охарактеризованные иммунодоминантные антигены чумного микроба (*F1* и *V*-антиген) [6]. Однако подобные препараты не лишены определенных недостатков: дорогостоящая очистка специфических белков, отличие конформации выделенного белка от конформации в организме возбудителя, слабый иммунный ответ за счет неспособности запускать клеточно-опосредованный иммунитет, отсутствие защиты в отношении штаммов чумного микроба, лишенных *F1* [8, 17], а также известной вариабельности в структуре *V*-антигена [13]. В качестве одной из актуальных проблем ведущими специалистами ВОЗ в области разработки чумных вакцин признается

© 2026 г. Буданова А.А., Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А.

* Автор для переписки:

Буданова Ангелина Андреевна

к.б.н., с.н.с. отдела иммунологии, ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

E-mail: anglinca@mail.ru

поиск действенных способов повышения эффективности вакцинирующих препаратов, а также выявление надежных коррелятов защиты при формировании поствакцинального иммунитета [11].

Среди подходов, обеспечивающих повышение иммуногенности субъединичных чумных вакцин, наиболее перспективными являются: улучшение антигенных характеристик *F1* и *LcrV*, что достигается, например, конструированием растворимой формы капсульного антигена (*F1*), характеризующейся повышенной иммуногенностью [14]; введение в состав вакцинирующего препарата адъювантов, совместимых с компонентами вакцин и обладающих выраженным иммуногенным потенциалом, одобренных к применению в медицинской практике; применение дополнительных антигенных компонентов, способных усиливать иммунный ответ и протективный потенциал разрабатываемых субъединичных вакцин, например, *Pla*, *ОтрА*, *ОтрХ* и *Ail* [3, 9]; разработка эффективных способов доставки компонентов вакцины в организм (микроинкапсулирование) [7]. В ряде случаев для потенцирования действия вакцины оправданным представляется использование иммуномодулирующих препаратов, например, азоксимера бромид (Полиоксидоний) [4, 18].

Цель данной работы — комплексная иммунобиологическая характеристика рекомбинантных антигенов чумного микроба и оценка эффективности их применения в качестве бустерирующего компонента живой чумной вакцины на модели бубонной чумы.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов, плазмиды и среды, использованные в работе

В работе использовали культуру вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, культуру вирулентного тест-штамма *Y. pestis* 231 (708); для выделения и очистки целевых рекомбинантных антигенов применяли ранее сконструированные штаммы, полученные на основе коммерческого штамма *E. coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen, США). Микроорганизмы выращивали на жидкой и плотной среде LB. Штаммы, созданные на основе *E. coli* BL21 Star (DE3) с рекомбинантными плазмидами, содержащими клонированные гены, выращивали на LB-агаре с добавлением селективного антибиотика (ампициллин в концентрации 50 мкг/мл).

Очистка рекомбинантных белков

Хроматографическую очистку целевых белков осуществляли в комбинированных условиях согласно

стандартному протоколу производителя коммерческого набора ProBond™ Purification System (Invitrogen, Германия).

Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле

Контроль экспрессии после индукции и последующего выделения белков осуществляли электрофоретически. Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле осуществляли в вертикальной камере Mini-Protean® Tetra Cell (Bio-Rad) по инструкции фирмы производителя, при силе тока 35 мА в течение 3 ч. Белки визуализировали окрашиванием гелей в растворе Кумасси R-250. Результаты электрофоретического разделения регистрировали на гель-документирующей системе E-Box (Vilber Lourmat, Франция).

Иммуноблот

Для анализа иммуноспецифичности полученных препаратов рекомбинантных антигенов чумного микроба проводили иммуноблотинг по модифицированному методу [16]. Предварительно подвергнутые электрофоретическому разделению белки культуральных дезинтегратов переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C (Amersham, США) с помощью приставки к камере для белкового электрофореза (Amersham, США) в соответствии с инструкцией фирмы.

Иммуноферментный анализ

Для определения уровня продукции рекомбинантных антигенов сконструированными генно-инженерными штаммами применяли твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием антител, диагностических к IgG кролика, меченных пероксидазой (Sigma-Aldrich США).

Двойная иммунодиффузия

Иммунодиффузионный анализ рекомбинантных антигенов осуществляли согласно общепринятой методике. На горизонтально расположенную обезжиренную стеклянную пластину аккуратно насливали 1% раствор агарозы в забуференном физиологическом растворе, получая равномерный слой толщиной 1–1,5 мм. После застывания геля вырезали лунки диаметром 4 мм и наносили в них изучаемые препараты. Реакцию преципитации проводили в течение 16–18 часов при комнатной температуре во влажной камере. Преципитат выявляли окрашиванием красителем Кумасси R-250.

Животные

В экспериментах *in vivo* было использовано 140 мышей линии BALB/c (18±2) г, полученных из питомника ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (г. Саратов). Все

манипуляции с животными выполняли в соответствии с Приказом Минздрава России от 01.04.2016 № 199Н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», Директивой № 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей» и «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследований одобрен Комиссией по биоэтике при ФКУН Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (протокол № 3 от 20.03.2023г.).

Оценка протективных свойств

В условиях эксперимента сравнивали протективный потенциал различных схем применения бустирующего компонента ($F1_{mut}$ и Ail в дозе 10 мкг каждого компонента в сочетании с адьювантом $(Al(OH)_3)$). Линейным мышам через 21 сутки после иммунизации вакцинным штаммом *Y. pestis* EV линии НИИЭГ в дозе 5000 КОЕ вводили подкожно бустирующий компонент (1-я группа) и бустирующий компонент в сочетании с иммуномодулятором (азоксимера бромид) — 2-я группа. В качестве группы сравнения были взяты мыши, иммунизированные только вакцинным штаммом (3-я группа), и интактные животные (группа контроля). В экспериментальные группы и группу сравнения были взяты по 40 животных, контрольная группа состояла из 20 мышей.

Моделирование чумной инфекции

Бубонную чуму моделировали на 21-е сутки после применения бустирующего компонента путем подкожной инокуляции 0,2 мл культуры вирулентного тест-штамма *Y. pestis* 231 в дозе 400 ЛД₅₀. Наблюдение за животными осуществляли в течение 20 дней. Гибель биомодели от чумы подтверждали наличием чумного микроба в посевах крови на бульон Хоттингера (рН 7,2) и органов на агар Хоттингера (рН 7,2) с гемолизированной кровью и генцианвиолетом, а также соответствующей для чумной инфекции патологоанатомической картиной. У животных определяли показатели выживаемости (процентное соотношение выживших на конец эксперимента животных к общему количеству взятых в эксперимент животных данной группы), средней продолжительности жизни павших в эксперименте животных (СПЖ), а также длительность инкубационного периода до манифестации заболевания.

Статистические методы

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2010». Достоверность различий сравниваемых величин оценивали с помощью

парного t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ уровней продукции целевых антигенов полученными рекомбинантными штаммами

Одним из подходов, направленных на повышение иммуногенности капсульного антигена чумного микроба, а следовательно и повышение эффективности субъединичных чумных вакцин, является конструирование так называемой растворимой формы капсульного антигена [8]. В данной работе методом твердофазного ИФА с применением специфичных кроличьих иммунных сывороток, полученных к рекомбинантным антигенам, а также стандартных растворов данных антигенов, определены уровни продукции целевых продуктов сконструированных нами ранее рекомбинантных продуцентов, созданных на основе коммерческого штамма *E. coli* BL21 Star (DE3) [1]. В качестве стандартных растворов антигенов применялись хроматографически очищенные рекомбинантные антигены чумного микроба, концентрация которых была известна. Концентрация стандартного раствора капсульного антигена составляла 1,079 мг/мл, его растворимой формы 0,726 мг/мл, рекомбинантного белка Ail 0,687 мг/мл.

Продукция капсульного антигена рекомбинантным штаммом *E. coli* BL21 Star (DE3)/pET32a ($F1$) составила 1,05 мкг/мл, продукция растворимой формы капсульного антигена штаммом *E. coli* BL21 Star (DE3)/pET32a ($F1_{mut}$) — 5,67 мкг/мл, продукция белка Ail сконструированным штаммом *E. coli* BL21 Star (DE3)/pET32a (Ail) — 343,5 мкг/мл.

Анализ иммуноспецифичности рекомбинантного капсульного антигена, его растворимой формы и белка Ail чумного микроба

В реакции иммуноблота с иммунной сывороткой, полученной к рекомбинантному капсульному антигену, на уровне электрофоретической подвижности белков $F1$ и $F1_{mut}$ отмечено образование детектируемого иммунного комплекса (рисунок 1).

Ранее проведенный анализ иммуноспецифичности рекомбинантного капсульного антигена чумного микроба и его растворимой формы, основанный на использовании ферментной метки (дот-анализ), показал, что очищенные на никель-хелатном сорбенте препараты указанных антигенов практически с одинаковой интенсивностью взаимодействуют с иммунной сывороткой, полученной к рекомбинантному капсульному антигену чумного микроба

[1]. По результатам сравнительной иммунодиффузии выявлены идентичные антигенные детерминанты капсульного антигена чумного микроба и его растворимой формы, а также отмечена специфичность рекомбинантного белка *Ail* к иммунной сыворотке, полученной на данный антиген (рисунок 2).

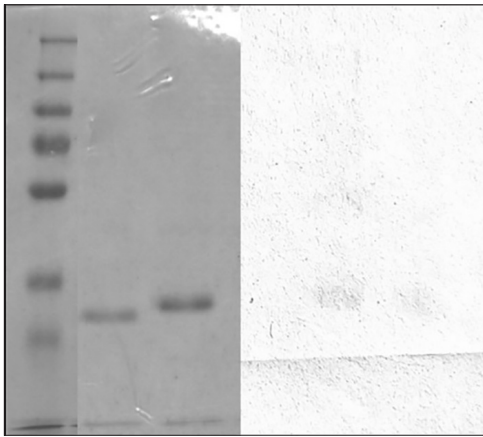


Рис. 1. Результаты денатурирующего электрофореза в ПААГ и иммуноблота рекомбинантных антигенов с иммунной сывороткой: 1 — маркер молекулярных масс; 2 — очищенный на никель-хелатном сорбенте препарат рекомбинантного *F1*; 3 — очищенный на никель-хелатном сорбенте препарат растворимой формы *F1*; 4 — иммуноблоттинг препарата очищенного рекомбинантного *F1*; 5 — иммуноблоттинг препарата растворимой формы *F1*

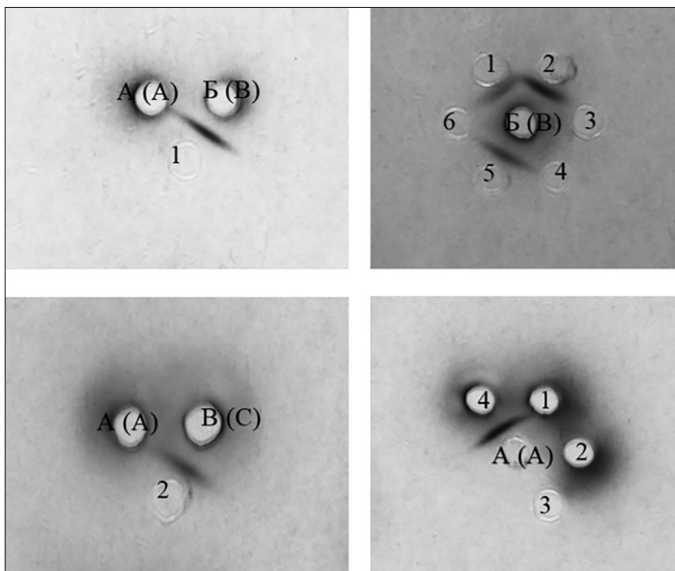
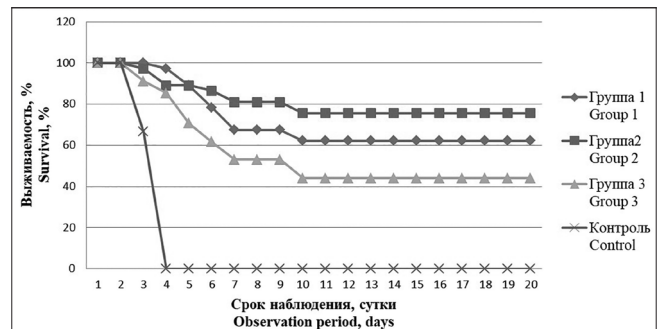


Рис. 2. Результат иммунодиффузионного анализа препаратов хроматографически очищенных рекомбинантных антигенов чумного микроба с кроличьими иммунными сыворотками: А — кроличья иммунная сыворотка, полученная к рекомбинантному белку *Ail*. Б — кроличья иммунная сыворотка, полученная к ре-

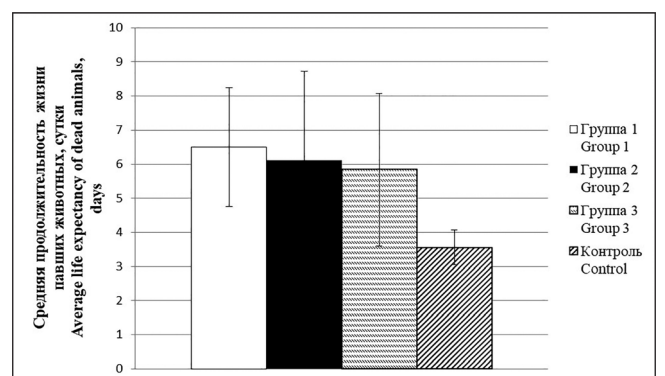
комбинантному *F1*. В — кроличья иммунная сыворотка, полученная к растворимой форме *F1* ($F1_{mul}$). 1,5 — препарат хроматографически очищенного рекомбинантного белка *F1*. 2 — препарат хроматографически очищенного рекомбинантного белка $F1_{mul}$. 4 — препарат хроматографически очищенного рекомбинантного белка *Ail*. В качестве контроля применялся фосфатно-солевой буфер (3,6)

Изучение протективных свойств сочетанного применения рекомбинантных антигенов чумного микроба (растворимой формы капсульного антигена и белка *Ail*)

Установлено (рисунок 3.1), что показатель выживаемости животных во всех экспериментальных группах был существенно выше указанного показателя для контрольной группы. У животных экспериментальных групп (1 и 2) отмечено увеличение выживаемости как по сравнению с контролем, для которого процент павших животных составил 100%, так и с группой сравнения (группа 3). Показатели выживаемости белых мышей в экспериментальных группах (1 и 2) составляли 62% и 76% соответственно, что превышало значения аналогичных показателей для мышей, иммунизированных только *Y. pestis* EV НИИЭГ (44%) в 1,4 и 1,7 раза соответственно.



I



II

Рис. 3. Влияние совместного применения рекомбинантных антигенов чумного микроба в схемах ревакцинации против чумы на выживаемость (I) и продолжительность жизни белых мышей линии Balb/c (II) в условиях подкожного заражения 400 ЛД₅₀ *Y. pestis* 231

Зарегистрировано увеличение СПЖ, а также инкубационного периода в среднем на 24–48 часов, в схемах применения бустирующего компонента как в сочетании, так и без азоксимера бромида по сравнению с группой мышей, иммунизированных только вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ. Так, если у животных группы 1 СПЖ составила 6,5 суток, в группе 2 – 6,1 суток, то для животных, иммунизированных только вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ – 5,8 суток (в контроле – 3,5 суток) (рисунок 3.И).

Заключение

В качестве высокоэффективных продуцентов иммуногенных антигенов широкое применение находят штаммы *E. coli* [12, 15]. В данной работе методами иммунохимического анализа определены уровни продукции рекомбинантных антигенов продуцентами, созданными на основе коммерческих штаммов *E. coli*. Полученные данные подтверждают описанные ранее в работах зарубежных авторов сведения о более высокой продукции растворимой формы капсульного антигена по сравнению с нативной формой, что объясняется особенностями фолдинга белковой молекулы [14]. Применение методов серологического анализа позволило подтвердить специфичность полученных рекомбинантных антигенов чумного микроба, а также установить в структуре капсульного антигена и его растворимой формы наличие общих эпитопов в составе белковых молекул, обусловленных аминокислотной последовательностью (секвенциальные эпитопы), что подтверждается ранее полученными результатами дот-иммуноанализа.

Выявленные преимущества сочетанного применения бустирующего компонента с азоксимером бромида укладываются в диапазон ранее полученных данных о способности указанного иммуномодулятора повышать эффективность применения вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ [4] и свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований, направленных на подбор оптимальных иммуномодулирующих препаратов для сочетанного применения с белковыми антигенами. Полученные результаты сопоставимы с данными отечественных и зарубежных исследователей [2, 10] о возможности применения субъединичных вакцин в качестве бустирующего компонента в существующей схеме вакцинации против чумы для усиления гранд-иммунитета.

Таким образом, с применением иммунохимических методов доказана специфичность полученных в работе рекомбинантных антигенов чумного микроба, а также

определена продукция целевых иммуногенов сконструированными штаммами-продуцентами. Установлен факт повышения протективного эффекта живой чумной вакцины при применении в качестве бустирующего компонента охарактеризованных рекомбинантных антигенов. Выявленные преимущества включения иммуномодулирующего препарата в состав бустирующего компонента расширяют возможности совершенствования схем вакцинации против чумы.

Литература

1. Буданова А.А., Тучков И.В., Киреев М.Н., Микшис Н.И., Бугоркова С.А. Генно-инженерное конструирование продуцента модифицированной формы капсульного антигена чумного микроба с анализом целевого продукта *in silico* и *in vitro* // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2020. – Т. 16. – № 4. – С. 5–12.
2. Бывалов А.А., Кутырев В.В. Опыт использования антигенов *Yersinia pestis* для разработки чумной химической вакцины // Проблемы особо опасных инфекций. – 2010. – № 4. – С. 47–50.
3. Гапельченкова Т.В., Шайхутдинова Р.З., Трунякова А.С., Светоч Т.Э., Комбарова Т.И., Платонов М.Е., Борзилов А.И., Копылов П.Х., Дентовская С.В. Динамика антительного ответа морских свинок к белкам *Yersinia pestis* при чуме // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. – № 4. – С. 50–56.
4. Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Кудрявцева О.М., Кожевников В.А., Кравцов А.Л., Каштанова Т.Н., Щуковская Т.Н. Экспериментальная оценка эффективности применения вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ в сочетании с иммуномодуляторами // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – № 2. – С. 71–77.
5. Попов Н.В., Карнаухов И.Г., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Иванова А.В., Марцоха К.С., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Чипанин Е.В., Холин А.В., Лопатин А.А., Дубянский В.М., Ашибокоев У.М., Газиева А.Ю., Балахонов С.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Эпидемиологическая ситуация по чуме в мире. Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации на 2024 г. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2024. – № 1. – С. 67–75.
6. Фирстова В.В., Караулов А.В., Дятлов И.А. Современные направления разработок противочумных вакцин // Иммунология. – 2017. – Т. 38. – № 1. – С. 100–107.
7. Carvalho A.L., Miquel-Clopés A., Wegmann U., Jones E., Stentz R., Telatin A., Walker N.J., Butcher W.A., Brown P.J., Holmes S., Dennis M.J., Williamson E.D., Funnell S.G.P., Stock M., Carding S.R. Use of bioengineered human commensal gut bacteria-derived microvesicles for mucosal plague vaccine delivery and immunization // Clin Exp Immunol. – 2019. – Vol. 96. – No. 3. – P. 287–304.

8. Davis K.J., Fritz D.L., Pitt M.L., Welkos S.L., Worsham P.L., Friedlander A.M. Pathology of experimental pneumonic plague produced by fraction 1-positive and fraction 1-negative *Yersinia pestis* in African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) // Arch. Pathol. Lab. Med. — 1996. — Vol. 120. — P. 156–163.
9. Erova T.E., Rosenzweig J.A., Sha J., Suarez G., Sierra J.C., Kirtley M.L., van Lier C.J., Telepnev M.V., Motin V.L., Chopra A.K. Evaluation of protective potential of *Yersinia pestis* outer membrane protein antigens as possible candidates for a new-generation recombinant plague vaccine // Clin. Vaccine Immunol. — 2013. — Vol. 20. — No. 2. — P. 227–238.
10. Glynn A., Roy C.J., Powell B.S., Adamovicz J.J., Freytag L.C., Clements J.D. Protection against aerosolized *Yersinia pestis* challenge following homologous and heterologous prime-boost with recombinant plague antigens // Infect Immun. — 2005. — Vol. 73. — No. 8. — P. 5256–5261.
11. Plague vaccines. What R&D progress has been achieved and how can we accelerate development of a vaccine? [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/news-room/events/detail/2023/10/12/default-calendar/global-consultation-on-plague-vaccines> (дата обращения: 12.10. 2023).
12. Sivashanmugam A., Murray V., Cui C., Zhang Y., Wang J., Li Q. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli* // Protein Sci. — 2009. — Vol. 18. — P. 936–948.
13. Smiley S.T. Current challenges in the development of vaccines for pneumonic plague // Expert Rev. Vaccines. — 2008. — Vol. 7. — P. 209–221.
14. Tao P., Mahalingam M., Kirtley M.L., Van Lier C.J., Sha J., Yeager L.A., Chopra A.K., Rao V.B. Mutated and bacteriophage T4 nanoparticle arrayed F1-V immunogens from *Yersinia pestis* as next generation plague vaccines // PLoS Pathog. — 2013. — Vol. 9. — e1003495. doi: 10.1371/journal.ppat.1003495.
15. Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems // Appl Microbiol Biotechnol. — 2006. — Vol. 72. — P. 211–222.
16. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // Proc.Natl.Acad. Sci. USA. — 1979. — Vol. 76. — No. 9. — P. 4350–4354.
17. Welkos S.L., Davis K.M., Pitt L.M., Worsham P.L., Friedlander A.M. Studies on the contribution of the F1 capsule-associated plasmid ρ Fra to the virulence of *Yersinia pestis* // Contrib. Microbiol. Immunol. — 1995. — Vol. 13. — P. 299–305.
18. Williamson E.D., Kilgore P.B., Hendrix E.K., Neil B.H., Sha J., Chopra A.K. Progress on the research and development of plague vaccines with a call to action // NPJ Vaccines. — 2024. — Vol. 9. — Art. 162. doi: 10.1038/s41541-024-00958-1.

References

1. Budanova AA, Tuchkov IV, Kireyev MN, Mikshis NI, Bugorkova SA. Genno-inzhenernoye konstruirovaniye produktov modifitsirovannoy formy kapsul'nogo antigena chumnogo mikroba s analizom tselevogo produkta in silico i in vitro. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im. Yu.A. Ovchinnikova 2020; 16(4):5–12 (in Russian).
2. Byvalov AA, Kuttyrev VV. Opyt ispol'zovaniya antigenov *Yersinia pestis* dlya razrabotki chumnoy khimicheskoy vaksiny. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2010; 4:47–50 (in Russian).
3. Gapel'chenkova TV, Shaykhtudinova RZ, Trunyakova AS, Svetoch TE, Kombarova TI, Platonov MYe, Borzilov AI, Kopylov PKh, Dentovskaya SV. Dinamika antitel'nogo otveta morskikh svinok k belkam *Yersinia pestis* pri chume. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2022; 4:50–56 (in Russian).
4. Goncharova AYu, Bugorkova SA, Kudryavtseva OM, Kozhevnikov VA, Kravtsov AL, Kashtanova TN, Shchukovskaya TN. Eksperimental'naya otsenka effektivnosti primeneniya vaksinnogo shtamma *Yersinia pestis* EV NIEG v sochetanii s immunomodulyatorami. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2020; 2:71–77 (in Russian).
5. Popov NV, Karnaukhov IG, Kuznetsov AA, Matrosov AN, Ivanova AV, Martsokha KS, Korzun VM, Verzhutsky DB, Chipanin EV, Kholin AV, Lopatin AA, Dubyansky VM, Ashibokov UM, Gazieva AYu, Balakhonov SV, Kulichenko AN, Kuttyrev VV. Epidemiologicheskaya situatsiya po chume v mire. Prognoz epizooticheskoy aktivnosti prirodnykh ochagov chumy Rossiyskoy Federatsii na 2024 g. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2024; 1:67–75 (in Russian).
6. Firstova VV, Karaulov AV, Dyatlov IA. Sovremennyye napravleniya razrabotok protivochumnykh vaksin. Immunologiya 2017; 38(1):100–107 (in Russian).
7. Carvalho AL, Miquel-Clopés A, Wegmann U, Jones E, Stentz R, Telatin A, Walker NJ, Butcher WA, Brown PJ, Holmes S, Dennis MJ, Williamson ED, Funnell SGP, Stock M, Carding SR. Use of bioengineered human commensal gut bacteria-derived microvesicles for mucosal plague vaccine delivery and immunization. Clin Exp Immunol 2019; 96(3):287–304.
8. Davis KJ, Fritz DL, Pitt ML, Welkos SL, Worsham PL, Friedlander AM. Pathology of experimental pneumonic plague produced by fraction 1-positive and fraction 1-negative *Yersinia pestis* in African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*). Arch Pathol Lab Med 1996; 120:156–163.
9. Erova TE, Rosenzweig JA, Sha J, Suarez G, Sierra JC, Kirtley ML, van Lier CJ, Telepnev MV, Motin VL, Chopra AK. Evaluation of protective potential of *Yersinia pestis* outer membrane protein antigens as possible candidates for a new-generation recombinant plague vaccine. Clin Vaccine Immunol 2013; 20. — No. 2:227–238.
10. Glynn A, Roy CJ, Powell BS, Adamovicz JJ, Freytag LC, Clements JD. Protection against aerosolized *Yersinia pestis* challenge following homologous and heterologous prime-

- boost with recombinant plague antigens. *Infect Immun* 2005; 73(8):5256–5261.
11. Plague vaccines. What R&D progress has been achieved and how can we accelerate development of a vaccine? URL: <https://www.who.int/news-room/events/detail/2023/10/12/default-calendar/global-consultation-on-plague-vaccines> (date of access: 12.10. 2023).
 12. Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, Zhang Y, Wang J, Li Q. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Sci* 2009; 18:936–948.
 13. Smiley ST. Current challenges in the development of vaccines for pneumonic plague. *Expert Rev Vaccines* 2008; 7:209–221.
 14. Tao P, Mahalingam M, Kirtley ML, Van Lier CJ, Sha J, Yeager LA, Chopra AK, Rao VB. Mutated and bacteriophage T4 nanoparticle arrayed F1-V immunogens from *Yersinia pestis* as next generation plague vaccines. *PLoS Pathog* 2013; 9:e1003495. doi: 10.1371/journal.ppat.1003495.
 15. Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 72:211–222.
 16. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76(9):4350–4354.
 17. Welkos SL, Davis KM, Pitt LM, Worsham PL, Freidlander AM. Studies on the contribution of the F1 capsule-associated plasmid ρ Fra to the virulence of *Yersinia pestis*. *Contrib Microbiol Immunol* 1995; 13:299–305.
 18. Williamson ED, Kilgore PB, Hendrix EK, Neil BH, Sha J, Chopra AK. Progress on the research and development of plague vaccines with a call to action. *NPJ Vaccines* 2024; 9:162. doi: 10.1038/s41541-024-00958-1.

IMMUNOCHEMICAL ANALYSIS OF RECOMBINANT ANTIGENS OF THE PLAGUE MICROBE AND EVALUATION OF THE PROTECTIVE POTENTIAL OF THEIR COMBINED USE

A.A. BUDANOVA, A.Yu. GONCHAROVA, S.A. BUGORKOVA

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

In accordance with the target profile of the developed plague vaccines defined by the WHO expert group, the main attention of researchers is paid to the design of subunit preparations, the main components of which can be characterized in detail and studied by the mechanism of action. However, subunit vaccines, due to their inability to trigger an effective cell-mediated immune response, require additional inclusion of immunomodulatory components or the use of prime-boost vaccination schemes. The purpose of this work is a comprehensive immunobiological characterization of recombinant antigens of the plague microbe and an assessment of the effectiveness of their use as a boosting component of a live plague vaccine on a bubonic plague model. The production levels of recombinant antigens synthesized by previously created recombinant strains were determined. The presence of common epitopes in the protein molecules of the capsular antigen of the plague microbe and its soluble form, determined by the amino acid sequence (sequential epitopes), was established, and the specificity of the recombinant *Ail* protein to the immune serum obtained for this antigen was demonstrated. The protective properties of the boosting component after the use of the vaccine were studied strain *Yersinia pestis* EV NIEG on the model of bubonic plague, and also assessed the possibility of including azoximer bromide as an immunomodulatory drug in the antigen complex for revaccination. A reliable increase in the average life expectancy of dead animals, as well as the survival rate of linear white mice after the inclusion of a booster component in the vaccination scheme both in combination with azoximer bromide and without it, was experimentally established, which indicates the feasibility of further studies aimed at selecting optimal immunomodulatory drugs and studying the mechanisms of their action when used in combination with protein antigens to increase the effectiveness of specific plague prevention.

Keywords: plague; live plague vaccine; subunit vaccines; capsular antigen of the plague microbe; *Ail*; immunomodulator; protectiveness; survival.

Address:

Budanova A.A., Ph.D. in Biology
senior researcher Department of Immunology,
Russian Anti-Plague Institute «Microbe» of Rospotrebnadzor,
Saratov
E-mail: anglinca@mail.ru

Для цитирования:

Буданова А.А., Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А. Иммунохимический анализ рекомбинантных антигенов чумного микроба и оценка протективного потенциала их совместного применения. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2026; 22(1):7–14.

For citation:

Budanova A.A., Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A. Immunochemical analysis of recombinant antigens of the plague microbe and evaluation of the protective potential of their combined use. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2026; 22(1):7–14 (in Russian).

НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ БЕЛКА *EsCSDP3* РАСТЕНИЯ *EUTREMA SALSUGINEUM* (PALL.)

А.О. ШАМУСТАКИМОВА^{1,2*}, А.А. СОЛОВЬЁВ^{1,3}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, г. Москва, Россия

²Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса, Московская обл., г. Лобня

³Всероссийский центр карантина растений, Московская обл., г. Раменское

РНК-связывающие белки (RBP) — это ключевые регуляторы посттранскрипционных процессов, контролирующие судьбу молекул РНК в клетке. Они участвуют в сплайсинге, стабилизации, транспорте, трансляции и деградации РНК, обеспечивая точную настройку экспрессии генов в ответ на внешние и внутренние сигналы. В настоящей работе с применением разработанного нами ранее метода Halo-RPD (HaloTag RNA PullDown) и последующего высокопроизводительного секвенирования был исследован РНК-интерактом белка *EsCSDP3* растения *Eutrema salsugineum* у закалённых и незакалённых растений *Arabidopsis thaliana*. Результаты показали, что среди большого пула кодирующих РНК, был обнаружен широкий спектр некодирующих РНК, на основании чего выявлены функциональные взаимосвязи в работе белка как при оптимальных температурах, так и после холодового закаливания.

Ключевые слова: *Eutrema salsugineum*; *Arabidopsis thaliana*; РНК-мишени; некодирующие РНК; белок с доменом холодового шока; *EsCSDP3*; Halo-RPD.

Введение

Для глубокого понимания процессов роста, развития и адаптации растений необходимо детальное исследование механизмов восприятия, обработки, передачи и формирования ответных реакций на внешние стимулы. Посттранскрипционная регуляция этих механизмов представляет собой одну из наиболее тонко настраиваемых систем в растительном организме. РНК-связывающие белки (RBP) играют ключевую роль в функционировании данной системы, обеспечивая ее слаженную работу. RBP представляют собой белки с разнообразными структурными характеристиками. В геноме модельного растения *Arabidopsis thaliana* кодируется более 2700 RBP [19], часть из которых регулирует широкий спектр биологических процессов, начиная от организации хроматина и заканчивая трансляцией и модификацией РНК, как в нормальных условиях роста и развития, так и при воздействии стрессовых факторов [13].

Согласно доменной структуре, РНК-связывающие белки, как правило, подразделены на группы. Одна из крупных групп именуется GRPs (от англ. glycine rich proteins — глицин-богатые белки). Эта группа получила своё название благодаря наличию на С-конце белков протяжённых участков, обогащённых глицином. В свою очередь, GRPs подразделяются на три класса в зависимости от архитектуры и комбинации доменов в своём составе [16]. К третьему классу относят белки с доменом холодового шока (CSDPs). Домен холодового шока (Cold Shock Domain, CSD) представляет собой один из наиболее эволюционно консервативных доменов, известных на сегодняшний день [5]. CSDPs растений содержат непосредственно домен холодового шока и цинковые пальцы ретровирусного типа (CCCH). В ряде научных исследований было продемонстрировано, что как сам домен, так и каждый из цинковых пальцев обладают способностью связывать РНК [3]. Для исследования РНК-связывающих белков применяются как традиционные методы, такие как выделение, очистка, определение аминокислотной последовательности и установление локализации белка, так и специфические подходы для анализа РНК-связывающей активности и идентификации РНК-мишеней. Работ по поиску и анализу РНК-мишеней растений на настоящий момент не так много. Что касается GRP белков, то наиболее изученным на данный момент является GRP7. На-

© 2026 г. Шамустакимова А.О., Соловьёв А.А.

* Автор для переписки:

Шамустакимова Анастасия Олеговна
научный сотрудник, Лаборатория устойчивости растений к стрессовым факторам, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва
E-mail: nastja_sham@mail.ru

пример, РНК-мишени этого белка искали при помощи метода RIP-qPCR [31]. Метод сочетал в себе РНК-иммунопреципитацию с обработкой растительной ткани формальдегидом для создания обратимых сшивок и последующую количественную ПЦР генов-кандидатов. С помощью метода iCLIP-seq для данного белка удалось найти сайты связывания с РНК [17].

Несмотря на растущий интерес к изучению РНК-связывающих белков, существует множество пробелов в изучении их свойств и идентификации истинных РНК-мишеней.

В ходе научных исследований, проводимых в нашей лаборатории, был впервые идентифицирован ген *EsCSDP3* (ранее *TsCSDP3*) у растения *Eutrema salsugineum*. Установлено, что экспрессия данного гена активируется при низких температурах. Продукт гена, кодируемый *EsCSDP3*, обладает способностью связывать и плавить ДНК и РНК-биконы. *Eutrema salsugineum* (Pall.) является экстремофитом, устойчивым к высоким концентрациям солей, экстремально низким температурам и засушливым условиям [7]. Ранее в нашей лаборатории было показано, что сверхэкспрессия гена *EsCSDP3* в растениях *A. thaliana*, подвергшихся холодному закаливанию, способствует повышению их морозостойчивости [25].

Цель данной работы заключалась в поиске РНК-мишеней белка, кодируемого геном *EsCSDP3*, в трансгенных растениях *Arabidopsis thaliana* до и после холодного закаливания.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были использованы два вида растений: *Arabidopsis thaliana* (Columbia) и *Eutrema salsugineum*, экотип Якутск (Республика Саха, 61°N; 130°E).

Получение генетических конструкций и трансгенных растений

Ген *EsCSDP3* был амплифицирован и клонирован в модифицированный нами вектор *ret28* (несущий белок *HaloTag*) для трансформации штамма *E. coli*. Векторы *pBI121* и *ret28-EsCSDP3-HaloTag* были обработаны рестриктазами *Sac1* и *Xba1*. Фрагменты, полученные после рестрикции, были лигированы с помощью T4 DNA Ligase (Thermoscientific, США). Лигирующая смесь была трансформирована в культуру клеток методом электропорации, культура клеток рассеяна на чашки со средой LB. Выросшие колонии были проверены с помощью ПЦР с праймерами F-*pBI-sec* и R-*pBI-sec* (таблица 1).

Таблица 1

Праймеры, использованные для проверки клонов *E. coli* и *A. thaliana*

Название праймера	Последовательность
F- <i>pBI-sec</i>	5'-AGT GGA TTG ATG TGA TAT CTC C-3'
R- <i>pBI-sec</i>	5'-ATC TCA TAA ATA ACG TCA TGC ATT A-3'
Halo sec F2	5'-GGG-GTC-GAA-TGG-AAA-GCC-3'

Далее плаزمида была наработана в клетках *E. coli* и выделена с помощью набора QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Германия). Полученной конструкцией методом электропорации была трансформирована культура клеток *A. thaliana* и рассеяна на чашки со средой LB. Выросшие колонии были проверены с помощью ПЦР с использованием праймеров F-*pBI-sec* и R-*HaloseqF2* (см. таблицу 1).

Далее с каждого варианта был отобран единичный клон, высеян в пробирку с 10 мл питательной среды LB, антибиотиками: канамицином и рифампицином. Выращивали бактерию 24 часа в качалке при 180 об/мин. Трансгенные растения, несущие целевую конструкцию, получали с помощью агробактериальной трансформации методом «Floral dip» [33]. С растений были собраны

семена и высажены на питательную среду с селективным фактором канамицином.

Подтверждение экспрессии белка EsCSDP3-HaloTag

В общей сложности было получено пять растений, устойчивых к канамицину. Экспрессию белка подтвердили при помощи красителя TMR ligand (Promega Corporation, США). На определение брали 20–100 мг листьев растений. Листья растирали в буфере: 50 mM HEPES, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 10 мкМ ZnSO₄ с добавлением PMSF и коктейля ингибиторов протеиназ. Лизат центрифугировали 5 минут на 14 000 об/мин при 4 °C. Из лизата отбирали 29 мкл и добавляли к нему 1 мкл TMR ligand (Promega Corporation, США) в концентрации 50 мкМ. Инкубировали в темноте при

комнатной температуре 15 минут, добавляли 10 мкл 2X SDS загрузочного буфера, прогревали 3 минуты при 70 °С и наносили на полиакриламидный гель. После электрофореза гель помещали в денситометр и измеряли флуоресценцию на длине волны 580 нм.

Поиск РНК-мишеней с помощью метода Halo-RPD

В эксперименте по поиску РНК мишеней белка *EsCSDP3* использовали Т3 поколение растений арабидопсиса с подтверждённой экспрессией белка *EsCSDP3-HaloTag*. На четвёртую неделю после посадки с данных растений были собраны навески ткани молодых листьев и заморожены в жидком азоте для последующего использования. После этого те же растения подвергали на протяжении трех недель закаливанию при 4 °С. По истечению этого времени с них были собраны навески листьев и заморожены.

Для эксперимента использовали по 100 мг предварительно замороженной в жидком азоте листовой ткани. Гомогенизацию проводили в охлаждённых ступках с помощью пестиков. Ткань помещали в ступку, наливали небольшое количество жидкого азота и гомогенизировали до образования порошкообразной массы. Полученный порошок быстро переносили в пробирку, содержащую 350 мкл лизирующего буфера следующего состава: 50 mM HEPES-буфер (pH 7.5), 150 mM KCl, 0.5% Triton X-100, 0,1% Tween20, 0,1 mM бензамидина HCl, 55 мкМ пенантролина, 10 мкМ бестатина, 20 мкМ леупептина, 5 мкМ пепстатина А, 1 mM PMSF, 1 mM ДТТ, 100 мкМ ZnSO₄ и 0,4 ед./мкл RiboLock™ (Thermo Fisher Scientific, США). Далее следовали разработанному нами ранее методу Halo-RPD [23]. Суть метода заключалась в инкубировании лизата трансгенных растений со смолой Halolink (Promega Corporation, США) для связывания химерного белка в комплексе с РНК. В дальнейшем смолу осаждали центрифугированием и отмывали от неспецифической РНК. В пробирку с промытой смолой добавляли раствор Extract RNA и выделяли РНК.

Секвенирование и биоинформатическая обработка

Полученные растворы РНК, использовали для синтеза первой цепи кДНК. Всю пробоподготовку осуществляли с помощью набора Truseq LT + RiboZero deplete (Illumina, США), следуя протоколу. Секвенирование осуществляли на приборе MiSeq (Illumina, США), парноконцевыми прочтениями размером 150 п.н. с каждой стороны. Осуществляли контроль качества прочтений с помощью программы FastQC. Избавлялись от адаптеров в программе Trimmomatic (<https://github.com/timflutre/>

trimmomatic). Обработанные данные загружали в облачную платформу Galaxy (<https://galaxyproject.org/>), где проводили картирование на геном *A. thaliana* версии TAIR 10 при стандартных параметрах. Подсчитывали количество фрагментов для парноконцевых прочтений, используя программу Rsubread (<https://github.com/bioconductor-source/Rsubread>). Осуществляли сортировку данных, при которой удаляли все гены с нулевым счётом, а также встречающиеся только у одного растения. Итоговая таблица содержала список транскриптов, обнаруженных у двух и более анализируемых растений, и количество фрагментов, приходящихся на данные локусы.

Название генов в каждой подгруппе копировали и вставляли в поисковую строку программы «ShinyGo» (<https://bioinformatics.sdstate.edu/go77/>). Анализировали группы на функциональное обогащение терминами генной онтологии по участию в биологических процессах.

Результаты и обсуждение

Белки с доменом холодового шока являются интересными объектами для изучения РНК-связывающей способности, поскольку содержат в своём составе несколько доменов. По литературным данным, полученным на белке арабидопсиса CSDP1, известно, что N-концевая часть связывает поли-U, тогда как C-концевая — поли-G [10]. Поскольку истинные мишени до настоящего момента не известны, можно предположить, что такая предпочтительность приведёт к связыванию с большим спектром РНК.





В настоящем исследовании мы использовали трансгенные растения *A. thaliana*, экспрессирующие химерный белок *EsCSDP3-HaloTag* для поиска нативных РНК мишеней. В качестве подхода использовали соосаждение РНК-белковых комплексов и дальнейший анализ полученного пула РНК с использованием высокопроизводительного секвенирования.

По результатам биоинформатического анализа на платформе Galaxy [8] была составлена таблица, содержащая список обнаруженных транскриптов хотя бы у двух из пяти проанализированных растений до прохождения холодового закалывания и после. Для облегчения анализа, полученные транскрипты были отнесены к четырём подгруппам (таблица 2).

Как видно из таблицы, в исследовании было обнаружено большое число как мРНК, так и разнообразный спектр некодирующих РНК. В данной статье рассмотрим подробнее представителей группы нкРНК, обнаруженных нами (рисунок 1).

Таблица 2

Количественное распределение видов РНК, обнаруженных в элюате химерного белка EsCSDP3-HaloTag у закалённых и незакалённых растений *A. thaliana*

Группа	Подгруппа	РНК обнаружены в элюате:	Обнаруженные виды РНК и их количество, ед.						
			мРНК	рРНК	днРНК	мяРНК	мякРНК	нкРНК	пре-микроРНК
до холодого закаливания	2ДЗ	 двух растений	402		3	7	4	1	1
	3ДЗ	 трёх и более растений	30	2	2	1			
после холодого закаливания	2ПЗ	 двух растений	104		5	3			1
	3ПЗ	 трёх и более растений	31	2		1			

Как видно из диаграммы, ряд транскриптов был обнаружен как в образцах до, так и после холодого закаливания. Подавляющее большинство уникальных транскриптов было обнаружено в элюате с незакалённых растений. Далее рассмотрим представителей каждого вида некодирующих РНК поподробнее.

Длинные некодирующие РНК (днРНК)

При анализе последовательностей в подгруппе 2ДЗ, был обнаружен нестабильный транскрипт GUT15 (от англ. gene with unstable transcript). Впервые он был идентифицирован в табаке, как ген, у которого отсутствует открытая рамка считывания [27]. Его индукция наблюдалась в ряде экспериментов, но лишь в 2018 году удалось установить, что некоторые изоформы этой

длинной некодирующей РНК несут в себе стабильный тРНК-подобный транскрипт, тогда как другие кодируют малую РНК GUT15-tRF-F5. [20]. На настоящий момент роль первоначального транскрипта и генерируемых из него форм остаётся неизвестна.

Среди других длинных некодирующих РНК были обнаружены транскрипты: AT1G07017 у трёх растений в подгруппе 3ДЗ, а также AT5G07745 и AT4G04565 у двух растений из той же группы. В элюатах двух закалённых растений было идентифицировано 4 РНК (AT1G04047, AT3G01845, AT3G06355 и AT4G04565). Примечательно, что РНК AT4G04565 присутствовала как у адаптированных, так и у незакалённых растений.

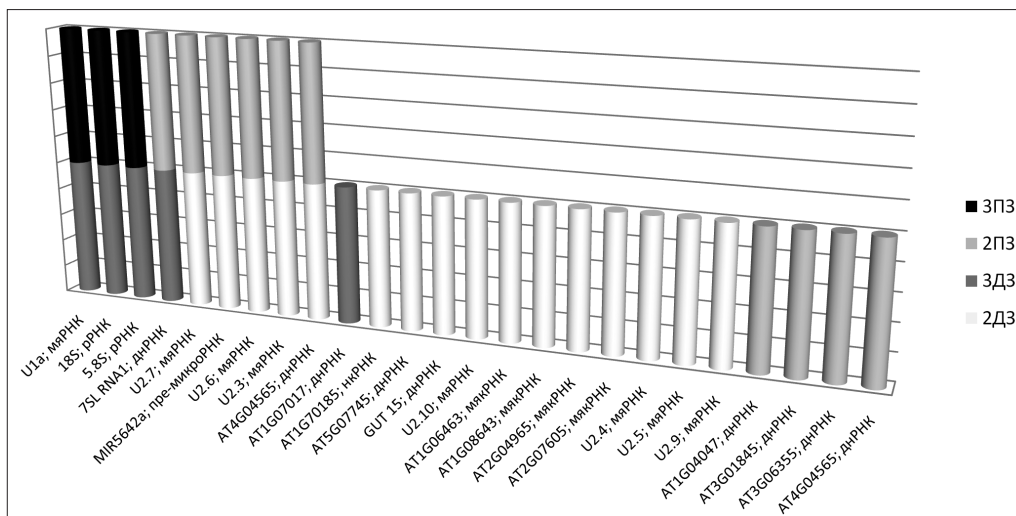


Рис. 1. Некодирующие РНК, обнаруженные в элюате химерного белка EsCSDP3-HaloTag у закалённых и незакалённых трансгенных растений *A. thaliana*

Литературных данных по указанным некодирующим РНК практически нет. Есть сведения лишь для *AT5G07745*, для которой было показано, что из длинной РНК синтезируется малая РНК, причём при продолжительном воздействии холодового стресса продукция малой РНК значительно снижалась [28].

Обнаруженная в обеих группах 7SL РНК также относится к длинным некодирующим РНК. Она входит в состав эукариотической частицы узнавания сигнала (от англ. signal recognition particle, SRP), которая инициирует ко-трансляционное встраивание секреторных белков в эндоплазматический ретикулум [32].

Малые ядерные и ядрышковые РНК (мяРНК и мякРНК)

Среди некодирующих РНК, присутствующих в большинстве образцов, как с закалённых, так и с незакалённых растений, были найдены транскрипты малой ядерной РНК U1 (мяРНК). Малые ядерные мяРНК, наряду с белковыми факторами, являются компонентами сплайсосомного комплекса. Транскрипты U2 были обнаружены в подгруппах 2ДЗ и 2ПЗ. У арабидопсиса U2 представлено семейством генов, различающихся по длине и первичной последовательности и, по-видимому, такое их разнообразие говорит о спектре выполняемых функций каждой из изоформ [30]. Из рисунка 1 видно, что обе группы объединяло наличие изоформ U2.7, U2.6 и U2.3, тогда как остальные (U2.10, U2.4, U2.5 и U2.9) были обнаружены исключительно у некалённых растений.

Большой спектр малых ядрышковых РНК (мякРНК) был обнаружен лишь в группе 2ДЗ у двух растений. Такой тип РНК участвует в метилировании и уридинилировании рРНК, тРНК и мяРНК. Из четырёх найденных в данном исследовании (*AT1G06463*, *AT1G08643*, *AT2G04965*, *AT2G07605*) лишь для *AT1G08643* (*SNOR146*) имеется информация в научной литературе. Так, было показано, что солевой стресс способствует переключению между производством мякРНК и мРНК [4]. Из данных двугибридного дрожжевого анализа известно, что белок *AtCSDP3* арабидопсиса локализуется как в цитоплазме, так и в ядре. Мы также на трансгенных растениях, экспрессирующих химерный белок *EsCSDP3-HaloTag*, показали ядерно-цитоплазматическую локализацию [1]. Отсюда можно сделать предположение, что наличие транскриптов U1 и U2 может указывать на косвенное или прямое взаимодействие белка с мяРНК и мякРНК в процессе роста и развития, а также для регуляции стрессового ответа.

Рибосомальные РНК (рРНК)

В нашей работе во всех десяти элюатах обнаруживалось наличие транскриптов 18S и 5.8S рРНК. Наблюдаемое явление было недавно описано и для *Lin28* — белка с доменом холодового шока животных. Несмотря на то, что главной и широко изученной мишенью этого белка является микроРНК *let-7*, 75% сайтов посадки приходится на рибосомальные и мРНК. Среди рибосомальных, белок предпочтительнее связывался именно с 5S и 5.8S рРНК [24]. Что касается растений, то для белка *AtRH7*, который является партнёром ортологичного белка *AtCSP3* арабидопсиса, показано влияние на накопление 35S и 18S прекурсоров рРНК [15]. Учитывая этот факт, авторы предположили, что *AtCSP3* и *AtRH7* регулируют биогенез рибосом, взаимодействуя в ядрышке.

Пре-микроРНК *miR5642a*

При анализе полученных данных среди картированных ридов как в образцах до-, так и после холодового закаливания, было обнаружено присутствие пре-микроРНК *miR5642a*. По литературным данным известно, что её зрелый вариант входит в список наиболее дифференциально экспрессирующихся при холодовом стрессе [2]. Поиск РНК-мишеней данной микроРНК в базе данных RNAInter [9] показал наличие 41 транскрипта различных генов (рисунок 2).

Сервис RNAInter также располагает информацией о РНК-связывающих белках-партнёрах. На рисунке 2 можно заметить наименования трёх белков: *GRP7*, *lin-28a* и *lin-28b*. Все они интересны тем, что напрямую или косвенно связаны с белками холодового шока растений. Так, *GRP7*, как и *CSDPs* относится к глицин-богатым белкам и что более значимо, в публикации Kim M.H. с коллегами [11] был идентифицирован, как белок — партнёр *AtCSDP3* арабидопсиса. Из 41 транскрипта, представленного на рисунке, *GRP7* связывался с 24 мРНК, чью экспрессию регулирует *miR5642a*. *Lin-28* изоформы а и b представляют собой белки с доменом холодового шока млекопитающих и являются факторами роста индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [24]. Что примечательно, как видно из рисунка 2, белки семейства *lin28* связывают РНК-транскрипты ортологов генов *HMGB3*, *RHB2* и *MSL3*. Белки группы высокой мобильности (от англ. High mobility group B), найденные в ядрах эукариот, участвуют в процессах репликации, транскрипции и сборки нуклеосом. У арабидопсиса это семейство насчитывает восемь представителей. В частности, ген *HMGB3* обладает повышенной экспрессией при холодовом стрессе [12]. Белок,

кодируемый геном *RHB2*, относится к эволюционно консервативным белкам, принимающим участие в таких процессах как: сигналинг, регуляция клеточного цикла, митохондриальное дыхание, клеточная смерть и старение [29]. Ген *MSL3* кодирует белок механочувствительного канала, который открывается в ответ на растяжение ли-

пидного бислюя. За счёт этого изменяется поток ионов, что контролирует деление, форму и размер пластид [6].

В результате группировки генной онтологии (GO) предсказанных мишеней *miR5642a* по участию в биологических процессах было выявлено 45 групп. В таблице 3 показан топ 10.

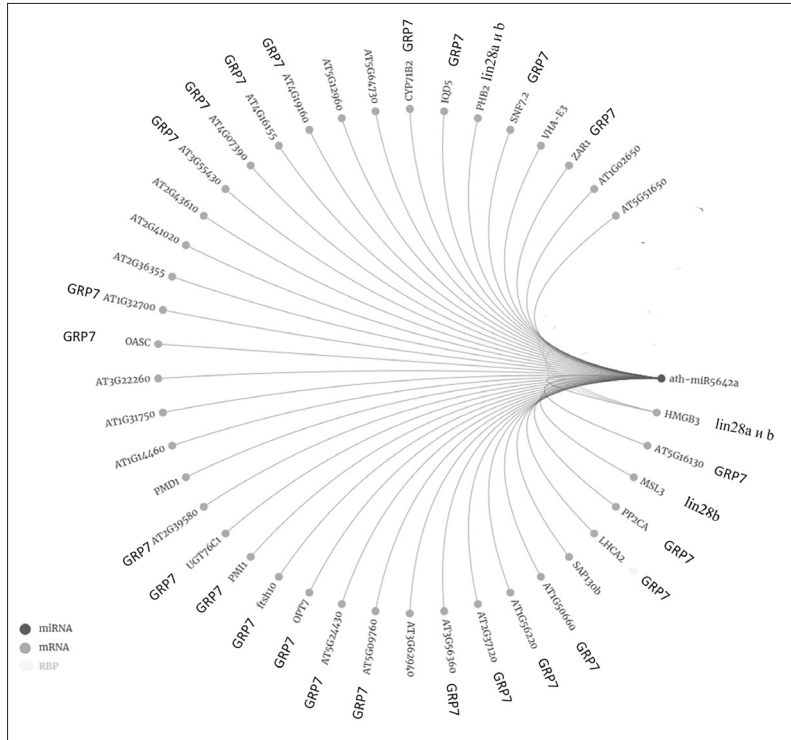


Рис. 2. мРНК-мишени *mir5642a* по результатам запроса в базе данных RNAInter

Таблица 3

Функциональное обогащение терминами генной онтологии при группировке мРНК-мишеней, предсказанных для микроРНК *miR5642a* сервисом RNAInter

Ожидаемая доля ложных отклонений (FDR)	Количество генов	Количество генов в пути регуляции	Избыточная представленность	Пути регуляции
8.7E-02	7	1845	4.6	Организация оргanelл
1.2E-01	4	1318	3.6	Трансмембранный транспорт
8.7E-02	3	194	18.6	Организация митохондрий
1.2E-01	3	760	4.7	Регуляция ответа на стимул
1.2E-01	3	633	5.7	Регуляция ответа на температурный стимул
1.3E-01	3	855	4.2	Ионный транспорт
1.5E-01	3	993	3.6	РНК процессинг
9.0E-02	2	118	20.4	Регуляция АБК-активируемого сигнального пути
9.0E-02	2	118	20.4	Регуляция ответа на алкоголь
9.0E-02	2	118	20.4	Регуляция клеточного ответа на алкоголь

Примечание: АБК — абсцизовая кислота.

Как видно таблицы 3, наибольшее число генов-мишеней miR5642a было задействовано в организации органелл. В целом, отмечены гены, ответственные за регуляцию ответа на стимул (температура, АБК, алкоголь), а также трансмембранный транспорт и РНК-процессинг.

Помимо этого, было семь генов, не распределённых по группам GO, но имеющих упоминания в литературных источниках. Так, ген *UGT76C1* кодирует UDP-гликозилтрансферазу, модулирующую цитокининовый ответ, путём N-гликозилирования цитокинина [21]. Ген *IQD5* кодирует ассоциированный с микротрубочками белок, который принимает участие в развитии эпидермы листа, регуляции биосинтеза целлюлозы и анизотропном росте клетки [18]. Ген *AT5G64730* кодирует белок с WD40-доменом. Мутация в этом гене приводит к глобальному снижению накопления эндогенных микроРНК. Белок способствует транскрипции первичных микроРНК (pri-microRNA) путём увеличения присутствия РНК-полимеразы II на промоторах микроРНК-кодирующих генов [14]. Ген *AT3G62940* кодирует деубиквитиназу. Было показано, что белок, находясь в ядре, участвует в регуляции транскрипции основных генов-репрессоров цветения, путём модификации хроматина [22].

Таким образом, присутствие в элюате прекурсора микроРНК в целом согласуется с полученными нами ранее данными о предпочтительности связывания белком *EsCSDP3* шпилечных структур [26].

Заключение

Проведённое нами исследование позволило найти и частично охарактеризовать потенциальные некодирующие РНК-мишени белка *EsCSDP3*. Анализ литературы показал, что экспериментально подтверждённые белковые партнёры *AtCSP3* связывают некоторые РНК-мишени, которые были обнаружены нами в комплексе с белком *EsCSDP3*. Так, функциональные взаимосвязи удалось установить для белка *AtRH7*, чья локализация в комплексе с *AtCSP3* в ядре, по-видимому, регулирует биогенез рибосом. Также интересно отметить, что белок-партнёр *GRP7* по данным базы *RNAInter* связывает мРНК ряда белков, на которые направлена работа зрелой микроРНК miR5642a. Нами также были обнаружены длинные некодирующие РНК, не имеющие упоминания в литературе, а также различные изоформы мяРНК и ряд неохарактеризованных мякРНК.

Таким образом, проведённое нами исследование расширяет представления о роли *EsCSDP3*, как РНК-связывающего белка, и открывает новые направления

для изучения молекулярных механизмов холодового закаливания.

Работа выполнена при поддержке Государственной программы № 0574-2014-0017 и РФФИ (грант № 14-04-32260) с использованием научного оборудования ЦКП «Биотехнология» ВНИИСБ (Москва, соглашение RFMEF162114×0003).

Литература

1. Шамустакимова А.О. Исследование белка *EsCSDP3* растения-экстремофита *Eutrema salsaugineum* (Pall.) // Клеточная биология и биотехнология растений: тезисы докл. III междунар. науч.-практ. конф. (Минск, 24–27 мая 2022 г.). — Минск, 2022. — С. 34.
2. Aslam M., Sugita K., Qin Y., Rahman A. Aux/IAA14 regulates microRNA-mediated cold stress response in *Arabidopsis* roots // Int. J. Mol. Sci. — 2020. — Vol. 21. — Art. 8441. doi: 10.3390/ijms21228441.
3. Budkina K.S., Zlobin N.E., Kononova S.V., Ovchinnikov L.P., Babakov A.V. Cold shock domain proteins: structure and interaction with nucleic acids // Biochemistry (Moscow). — 2020. — Vol. 85. — P. S1–S19. doi: 10.1134/S0006297920140011.
4. Fukudome A., Sun D., Zhang X., Koiwa H. Salt stress and CTD PHOSPHATASE-LIKE4 mediate the switch between production of small nuclear RNAs and mRNAs // Plant Cell. — 2017. — Vol. 29. — P. 3214–3233.
5. Graumann P.L., Marahiel M.A. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain // Trends Biochem. Sci. — 1998. — Vol. 23. — P. 286–290.
6. Ikeuchi M., Favero D.S., Sakamoto Y., Iwase A., Coleman D., Rymen B., Sugimoto K. Molecular mechanisms of plant regeneration // Ann. Rev. Plant Biol. — 2019. — Vol. 70. — P. 377–406.
7. Inan G., Zhang Q., Li P., Wang Z., Cao Z., Zhang H., Zhang C., Quist T.M., Goodwin S.M., Zhu J., Shi H., Damsz B., Charbaji T., Gong Q., Ma S., Fredricksen M., Galbraith D.W., Jenks M.A., Rhodes D., Hasegawa P.M., Bohnert H.J., Joly R.J., Bressan R.A., Zhu J.K. Salt cress. A halophyte and cryophyte *Arabidopsis* relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles // Plant Physiol. — 2004. — Vol. 135. — P. 1718–1737.
8. Jalili V., Afgan E., Gu Q., Clements D., Blankenberg D., Goecks J., Taylor J., Nekrutenko A. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2020 update // Nucl. Acids Res. — 2020. — Vol. 48. — P. W395–W402. doi: 10.1093/nar/gkaa434.
9. Kang J., Tang Q., He J., Li L., Yang N., Yu S., Wang M., Zhang Y., Lin J., Cui T., Hu Y., Tan P., Cheng J., Zheng

- H., Wang D., Su X., Chen W., Huang Y. RNAInter v4.0: RNA interactome repository with redefined confidence scoring system and improved accessibility // Nucl. Acids Res. — 2022. — Vol. 50. — P. D326–D332. doi: 10.1093/nar/gkab997.
10. Kim J.S., Park S.J., Kwak K.J., Kim Y.O., Kim J.Y., Song J., Jang B., Jung C.H., Kang H. Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* can promote the cold adaptation process in *Escherichia coli* // Nucl. Acids Res. — 2007. — Vol. 35. — P. 506–516.
 11. Kim M.H., Sonoda Y., Sasaki K., Kaminaka H., Imai R. Interactome analysis reveals versatile functions of *Arabidopsis* COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 3 in RNA processing within the nucleus and cytoplasm // Cell Stress and Chaperones. — 2013. — Vol. 18. — P. 517–525.
 12. Kwak K.J., Kim J.Y., Kim Y.O., Kang H. Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing high mobility group B proteins under high salinity, drought or cold stress // Plant and Cell Physiol. — 2007. — Vol. 48. — P. 221–231.
 13. Lee K., Kang H. Emerging roles of RNA-binding proteins in plant growth, development, and stress responses // Mol. and Cells. — 2016. — Vol. 39. — P. 179–185.
 14. Liang C., Cai Q., Wang F., Li S., You C., Xu C., Gao L., Cao D., Lan T., Zhang B., Mo B., Chen X. *Arabidopsis* RBV is a conserved WD40 repeat protein that promotes microRNA biogenesis and ARGONAUTE1 loading // Nature Commun. — 2022. — Vol. 13. — Art. 1217. doi: 10.1038/s41467-022-28872-x.
 15. Liu Y., Tabata D., Imai R. A cold-inducible DEAD-box RNA helicase from *Arabidopsis thaliana* regulates plant growth and development under low temperature // PLoS One. — 2016. — Vol. 11. — e0154040. doi: 10.1371/journal.pone.0154040.
 16. Ma L., Cheng K., Li J., Deng Z., Zhang C., Zhu H. Roles of plant glycine-rich RNA-binding proteins in development and stress responses // Int. J. Mol. Sci. — 2021. — Vol. 22. — Art. 5849. doi: 10.3390/ijms22115849.
 17. Meyer K., Köster T., Nolte C., Weinholdt C., Lewinski M., Grosse I., Staiger D. Adaptation of iCLIP to plants determines the binding landscape of the clock-regulated RNA-binding protein *AtGRP7* // Genome Biol. — 2017. — Vol. 18. — Art. 204. doi: 10.1186/s13059-017-1332-x.
 18. Mitra D., Klemm S., Kumari P., Quegwer J., Möller B., Poeschl Y., Pflug P., Stamm G., Abel S., Bürstenbinder K. Microtubule-associated protein IQ67 DOMAIN5 regulates morphogenesis of leaf pavement cells in *Arabidopsis thaliana* // J. Exp. Bot. — 2019. — Vol. 70. — P. 529–543.
 19. Muleya V., Maronedze C. Functional roles of RNA-binding proteins in plant signaling // Life. — 2020. — Vol. 10. — Art. 288. doi: 10.3390/life10110288.
 20. Plewka P., Thompson A., Szymanski M., Nuc P., Knop K., Rasinska A., Bialkowska A., Szweykowska-Kulinska Z., Karlowski W.M., Jarmolowski A. A stable tRNA-like molecule is generated from the long noncoding RNA GUT15 in *Arabidopsis* // RNA Biology. — 2018. — Vol. 15. — P. 726–738.
 21. Pokorna E., Hluska T., Galuszka P., Hallmark H.T., Dobrev P.I., Zaveska Drabkova L., Filipi T., Holubova K., Plíhal O., Rashotte A.M., Malbeck J., Novak O., Spíchal L., Brzobohaty B., Mazura P., Zahajska L., Motyka V. Cytokinin N-glucosides: Occurrence, metabolism and biological activities in plants // Biomolecules. — 2020. — Vol. 11. — Art. 24. doi: 10.3390/biom11010024.
 22. Radjacommaro R., Usharani R., Kuo C.H., Fu H. Distinct phylogenetic relationships and biochemical properties of *Arabidopsis ovarian* tumor-related deubiquitinases support their functional differentiation // Front. Plant Sci. — 2014. — Vol. 5. — Art. 84. doi: 10.3389/fpls.2014.00084.
 23. Shamustakimova A.O. Halo-RPD: searching for RNA-binding protein targets in plants // Vavilov J. Genet. and Breeding. — 2024. — Vol. 28. — Art. 74. doi:10.18699/vjgb-24-09.
 24. Tan F.E., Sathe S., Wheeler E.C., Yeo G.W. Non-microRNA binding competitively inhibits LIN28 regulation // Cell Repts. — 2021. — Vol. 36. — Art. 109517. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109517.
 25. Taranov V.V., Berdnikova M.V., Nosov A.V., Galkin A.V., Babakov A.V. Cold shock domain proteins in the extremophyte *Thellungiella salsuginea* (salt cross): gene structure and differential response to cold // Mol. Biol. — 2010. — Vol. 44. — P. 787–794.
 26. Taranov V.V., Zlobin N.E., Evlakov K.I., Shamustakimova A.O., Babakov A.V. Contribution of *Eutrema salsugineum* cold shock domain structure to the interaction with RNA // Biochemistry (Moscow). — 2018. — Vol. 83. — P. 1369–1379.
 27. Taylor C.B., Green P.J. Identification and characterization of genes with unstable transcripts (GUTs) in tobacco // Plant Mol. Biol. — 1995. — Vol. 28. — P. 27–38.
 28. Tiwari B., Habermann K., Arif M.A., Weil H.L., Garcia-Molina A., Kleine T., Mühlhaus T., Frank W. Identification of small RNAs during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* // BMC Plant Biol. — 2020. — Vol. 20. — Art. 253. doi: 10.1186/s12870-020-02511-3.
 29. Van Aken O., Pečenková T., Van De Cotte B., De Rycke R., Eeckhout D., Fromm H., De Jaeger G., Witters E., Beemster G. T.S., Inzé D., Van Breusegem F. Mitochondrial type-I prohibitins of *Arabidopsis thaliana* are required for supporting proficient meristem development // Plant J. — 2007. — Vol. 52. — P. 850–864.
 30. Vankan P., Filipowicz W. Structure of U2 snRNA genes of *Arabidopsis thaliana* and their expression in electroporated plant protoplasts // EMBO J. — 1988. — Vol. 7. — P. 791–799.
 31. Xiao J., Li C., Xu S., Xing L., Xu Y., Chong K. JACALIN-LECTIN LIKE1 regulates the nuclear accumulation of GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN7, influencing the RNA processing of FLOWERING LOCUS C antisense transcripts and flowering time in *Arabidopsis* // Plant Physiol. — 2015. — Vol. 169. — P. 2102–2117.

32. Yukawa Y., Matoušek J., Grimm M., Vrba L., Steger G., Sugiura M., Beier H. Plant 7SL RNA and tRNA(Tyr) genes with inserted antisense sequences are efficiently expressed in an in vitro transcription system from *Nicotiana tabacum* cells // Plant Mol. Biol. – 2002. – Vol. 50. – P. 713–723.
33. Zhang X., Henriques R., Lin S.S., Niu Q.W., Chua N.H. Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method // Nature Protocols. – 2006. – Vol. 1. – P. 641–646. doi: 10.1038/nprot.2006.97.

References

1. Shamustakimova AO. Issledovaniye belka *EsCSDP3* rasteniya-ekstremofita *Eutrema salsugineum* (Pall.). Kletochnaya biologiya i biotekhnologiya rasteniy: tezisy dokl. III mezhdunar. nauch.-prakt. konf. (Minsk, 24–27 maya 2022 g.). Minsk, 2022: 34 (in Russian).
2. Aslam M, Sugita K, Qin Y, Rahman A. Aux/IAA14 regulates microRNA-mediated cold stress response in *Arabidopsis* roots. *Int J Mol Sci* 2020; 21:8441. doi: 10.3390/ijms21228441.
3. Budkina KS, Zlobin NE, Kononova SV, Ovchinnikov LP, Babakov AV. Cold shock domain proteins: structure and interaction with nucleic acids. *Biochemistry (Moscow)* 2020; 85:S1–S19. doi: 10.1134/S0006297920140011.
4. Fukudome A, Sun D, Zhang X, Koiwa H. Salt stress and CTD PHOSPHATASE-LIKE4 mediate the switch between production of small nuclear RNAs and mRNAs. *Plant Cell* 2017; 29:3214–3233.
5. Graumann PL, Marahiel MA. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends Biochem. Sci* 1998; 23:286–290.
6. Ikeuchi M, Favero DS, Sakamoto Y, Iwase A, Coleman D, Rymen B, Sugimoto K. Molecular mechanisms of plant regeneration. *Ann Rev Plant Biol* 2019; 70:377–406.
7. Inan G, Zhang Q, Li P, Wang Z, Cao Z, Zhang H, Zhang C, Quist TM, Goodwin SM, Zhu J, Shi H, Damsz B, Charbaji T, Gong Q, Ma S, Fredricksen M, Galbraith DW, Jenks M A, Rhodes D, Hasegawa PM, Bohnert HJ, Joly RJ, Bressan RA, Zhu JK. Salt cress. A halophyte and cryophyte *Arabidopsis* relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles. *Plant Physiol* 2004; 135:1718–1737.
8. Jalili V, Afgan E, Gu Q, Clements D, Blankenberg D, Goecks J, Taylor J, Nekrutenko A. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2020 update. *Nucl Acids Res* 2020; 48:W395–W402. doi: 10.1093/nar/gkaa434.
9. Kang J., Tang Q., He J., Li L., Yang N., Yu S., Wang M., Zhang Y., Lin J., Cui T., Hu Y., Tan P., Cheng J., Zheng H., Wang D., Su X., Chen W., Huang Y. RNAInter v4.0: RNA interactome repository with redefined confidence scoring system and improved accessibility. *Nucl. Acids Res* 2022; 50:D326–D332. doi: 10.1093/nar/gkab997.
10. Kim J.S., Park S.J., Kwak K.J., Kim Y.O., Kim J.Y., Song J., Jang B., Jung C.H., Kang H. Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* can promote the cold adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucl Acids Res* 2007; 35:506–516.
11. Kim M.H., Sonoda Y., Sasaki K., Kaminaka H., Imai R. Interactome analysis reveals versatile functions of *Arabidopsis* COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 3 in RNA processing within the nucleus and cytoplasm. *Cell Stress and Chaperones* 2013; 18:517–525.
12. Kwak K.J., Kim J.Y., Kim Y.O., Kang H. Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing high mobility group B proteins under high salinity, drought or cold stress. *Plant and Cell Physiol* 2007; 48:221–231.
13. Lee K., Kang H. Emerging roles of RNA-binding proteins in plant growth, development, and stress responses. *Mol. and Cells* 2016; 39:179–185.
14. Liang C., Cai Q., Wang F., Li S., You C., Xu C., Gao L., Cao D., Lan T., Zhang B., Mo B., Chen X. *Arabidopsis* RBV is a conserved WD40 repeat protein that promotes microRNA biogenesis and ARGONAUTE1 loading. *Nature Commun* 2022; 13:1217. doi: 10.1038/s41467-022-28872-x.
15. Liu Y., Tabata D., Imai R. A cold-inducible DEAD-box RNA helicase from *Arabidopsis thaliana* regulates plant growth and development under low temperature. *PloS One* 2016; 11:e0154040. doi: 10.1371/journal.pone.0154040.
16. Ma L., Cheng K., Li J., Deng Z., Zhang C., Zhu H. Roles of plant glycine-rich RNA-binding proteins in development and stress responses. *Int. J. Mol. Sci* 2021; 22:5849. doi: 10.3390/ijms22115849.
17. Meyer K., Köster T., Nolte C., Weinholdt C., Lewinski M., Grosse I., Staiger D. Adaptation of iCLIP to plants determines the binding landscape of the clock-regulated RNA-binding protein *AtGRP7*. *Genome Biol* 2017; 18:204. doi: 10.1186/s13059-017-1332-x.
18. Mitra D, Klemm S, Kumari P, Quegwer J, Möller B, Poeschl Y, Pflug P, Stamm G, Abel S, Bürstenbinder K. Microtubule-associated protein IQ67 DOMAIN5 regulates morphogenesis of leaf pavement cells in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 2019; 70:529–543.
19. Muleya V, Marondedze C. Functional roles of RNA-binding proteins in plant signaling. *Life* 2020; 10:288. doi: 10.3390/life10110288.
20. Plewka P, Thompson A, Szymanski M, Nuc P, Knop K, Rasinska A, Bialkowska A, Szweykowska-Kulinska Z, Karlowski WM, Jarmolowski A. A stable tRNA-like molecule is generated from the long noncoding RNA GUT15 in *Arabidopsis*. *RNA Biology* 2018; 15:726–738.
21. Pokorna E, Hluska T, Galuszka P, Hallmark HT, Dobrev PI, Zaveska Drabkova L, Filipi T, Holubova K, Plíhal O, Rashotte AM, Malbeck J, Novak O, Spíchal L, Brzobohaty B, Mazura P, Zahajska L, Motyka V. Cytokinin N-glucosides: Occurrence, metabolism and biological ac-

- tivities in plants. *Biomolecules* 2020; 11:24. doi: 10.3390/biom11010024.
22. Radjacommaro R, Usharani R, Kuo CH, Fu H. Distinct phylogenetic relationships and biochemical properties of *Arabidopsis ovarian* tumor-related deubiquitinases support their functional differentiation. *Front Plant Sci* 2014; 5:84. doi: 10.3389/fpls.2014.00084.
 23. Shamustakimova AO. Halo-RPD: searching for RNA-binding protein targets in plants. *Vavilov J Genet and Breeding* 2024; 28:74. doi:10.18699/vjgb-24-09.
 24. Tan FE, Sathe S, Wheeler EC, Yeo GW. Non-microRNA binding competitively inhibits LIN28 regulation. *Cell Repts* 2021; 36:109517. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109517.
 25. Taranov VV, Berdnikova MV, Nosov AV, Galkin AV, Babakov AV. Cold shock domain proteins in the extremophyte *Thellungiella salsuginea* (salt cress): gene structure and differential response to cold. *Mol Biol* 2010; 44:787–794.
 26. Taranov VV, Zlobin NE, Evlakov KI, Shamustakimova AO, Babakov AV. Contribution of *Eutrema salsugineum* cold shock domain structure to the interaction with RNA. *Biochemistry (Moscow)* 2018; 83:1369–1379.
 27. Taylor CB, Green PJ. Identification and characterization of genes with unstable transcripts (GUTs) in tobacco. *Plant Mol Biol* 1995; 28:27–38.
 28. Tiwari B, Habermann K, Arif MA, Weil HL, Garcia-Molina A, Kleine T, Mühlhaus T, Frank W. Identification of small RNAs during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 2020; 20:253. doi: 10.1186/s12870-020-02511-3.
 29. Van Aken O, Pečenková T, Van De Cotte B, De Rycke R, Eeckhout D, Fromm H, De Jaeger G, Witters E, Beemster G TS, Inzé D, Van Breusegem F. Mitochondrial type-I prohibitins of *Arabidopsis thaliana* are required for supporting proficient meristem development. *Plant J* 2007; 52:850–864.
 30. Vankan P, Filipowicz W. Structure of U2 snRNA genes of *Arabidopsis thaliana* and their expression in electroporated plant protoplasts. *EMBO J* 1988; 7:791–799.
 31. Xiao J, Li C, Xu S, Xing L, Xu Y, Chong K. JACALIN-LECTIN LIKE1 regulates the nuclear accumulation of GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN7, influencing the RNA processing of FLOWERING LOCUS C antisense transcripts and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2015; 169:2102–2117.
 32. Yukawa Y, Matoušek J, Grimm M, Vrba L, Steger G, Sugiura M, Beier H. Plant 7SL RNA and tRNA(Tyr) genes with inserted antisense sequences are efficiently expressed in an in vitro transcription system from *Nicotiana tabacum* cells. *Plant Mol Biol* 2002; 50:713–723.
 33. Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH. Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols* 2006; 1:641–646. doi: 10.1038/nprot.2006.97.

NON-CODING RNAs AS POTENTIAL TARGETS OF THE *EsCSDP3* PROTEIN FROM *EUTREMA SALSUGINEUM* (PALL.)

A.O. SHAMUSTAKIMOVA^{1,2}, A.A. SOLOVIEV^{1,3}

¹ All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia;

² Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology, Lobnya, Russia;

³ All-Russia Center for Plant Quarantine, Ramenskoye, Russia

RNA-binding proteins (RBPs) are key regulators of post-transcriptional processes that control the fate of RNA molecules in a cell. They are involved in RNA splicing, stabilization, transport, translation, and degradation, providing fine-tuning of gene expression in response to external and internal signals. In this work, the *EsCSDP3* protein RNA interactome in cold-acclimated and non-cold acclimated *Arabidopsis thaliana* plants using the Halo-RPD (HaloTag RNA PullDown) method and subsequent NGS sequencing was studied. The results showed that among the large pool of coding RNAs, a wide range of non-coding RNAs was found, which revealed functional relationships in the protein function at normal condition and after cold acclimation.

Keywords: *Eutrema salsugineum*; *Arabidopsis thaliana*; RNA-targets; non-coding RNAs; cold shock domain protein; *EsCSDP3*; Halo-RPD.

Address:

Shamustakimova A.O.

research fellow, plant stress tolerance laboratory,

All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology,

Moscow

E-mail: nastja_sham@mail.ru

Для цитирования:

Шамустакимова А.О., Соловьёв А.А. Некодирующие РНК как потенциальные мишени белка *EsCSDP3* растения *Eutrema salsugineum* (Pall.). Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2026; 22(1):15–25.

For citation:

Shamustakimova A.O., Soloviev A.A. Non-coding RNAs as potential targets of the *EsCSDP3* protein from *Eutrema salsugineum* (Pall.). Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2026; 22(1):15–25 (in Russian).

ОСМОЛЯЛЬНОСТЬ КАК КРИТИЧЕСКИЙ ПАРАМЕТР КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА

А.А. САВЕНКОВА^{1*}, С.В. ГЕНЕРАЛОВ¹, Ю.А. ФОМИНА³, Е.Г. АБРАМОВА^{1,2},
И.В. ШУЛЬГИНА¹, О.А. ЛОБОВИКОВА¹, А.Г. СЕЛЕЗНЕВА¹, А.К. НИКИФОРОВ^{1,2}

¹ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов

²ФГОУ ВО Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии, г. Саратов

³ФГБОУ ВО Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского, г. Саратов

В целях обеспечения надлежащего качества антирабического иммуноглобулина требуется внедрение эффективных методов контроля качества на всех этапах производства, включая выпуск готового продукта. Внедрение в спецификацию показателя «Осмоляльность», определяемого криоскопическим методом, направлено на снижение риска возникновения неблагоприятных постинъекционных реакций и, как следствие, повышение уровня безопасности и переносимости лекарственного препарата для пациента.

Ключевые слова: антирабический иммуноглобулин; контроль качества; осмоляльность; криоскопический метод.

Введение

Концентрация осмотически активных веществ в растворах, предназначенных для парентерального применения, играет важную роль в поддержании гомеостаза и нормального функционирования организма. Осмоляльность отражает содержание растворенных веществ, способных повлиять на изменение осмотического давления в биологической системе. Значение показателя «Осмоляльность» определяется как сумма концентраций кинетически активных частиц (молекул, ионов или ионных комплексов), как основного действующего вещества, так и вспомогательных компонентов, в расчете на килограмм растворителя.

Резкое изменение осмотического давления влияет на транспорт веществ через клеточные стенки, нормализацию процессов микроциркуляции, водно-электролитного баланса и белкового обмена [6, 7]. Основной причиной таких осложнений является значительное отличие химических и физико-химических характеристик

инъекционных растворов от свойств тканей и жидкостей организма (кровь, кожа, подкожно-жировая клетчатка, скелетные мышцы и др.) [14]. Высокое содержание растворенных веществ, в том числе и вспомогательных, в составе препарата ведет к увеличению осмотического давления, или гиперосмотической (гипертонической) активности раствора. Повышенная осмотическая нагрузка способна вызывать тяжелые постинъекционные осложнения местного характера, включая повреждения эндотелия сосудов, воспалительные реакции и нарушение микроциркуляции в зоне введения [12, 14].

При внутримышечном введении гиперосмотического раствора возможно развитие серьезных осложнений, таких как выраженное локальное обезвоживание, сильное местное раздражение, асептическое воспаление, некроз и абсцесс, известные как синдром Николау [3, 5, 16]. При внутривенном введении высокая осмоляльность может спровоцировать такие физиологические нарушения, как расширение кровеносных сосудов, снижение артериального давления, развитие кровотечений и тромбозов. В случае применения гипосмоляльных растворов, возможны набухание и повреждение эритроцитов. В конечном итоге для минимизации риска развития побочных реакций, желательно введение изотоничных растворов лекарственных веществ [6].

Определение осмоляльности является важным показателем контроля качества для многих лекарственных препаратов. К таким препаратам относятся: офтальмологические, ряд назальных, ингаляционных, инфузионных

© 2026 г. Савенкова А.А., Генералов С.В., Фомина Ю.А., Абрамова Е.Г., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Селезнева А.Г., Никифоров А.К.

* Автор для переписки:

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

E-mail: savencova.vita@gmail.com

лекарственных препаратов (ЛП), рентгеноконтрастных препаратов и лекарственных препаратов для интратекального введения [6]. Осмоляльность считается одним из ключевых факторов, определяющих локальную переносимость парентеральных лекарственных средств [19], к которым относятся препараты иммуноглобулина.

Известны три основных способа введения инъекционных иммуноглобулиновых препаратов: внутривенный, подкожный и внутримышечный. При подкожном или внутримышечном введении препараты должны иметь небольшой объем, что требует высокой концентрации иммуноглобулина. Это связано с возможностью возникновения побочных реакций при введении инъекции большого объема у пациентов, таких как раздражение и дискомфорт, а также увеличение времени процедуры введения [11].

В Российской Федерации в настоящее время контроль осмоляльности применяется для иммуноглобулинов для внутривенного введения. При этом в отношении иммуноглобулинов, предназначенных для внутримышечных инъекций, в том числе и для антирабического иммуноглобулина российского производства, фармакопейные требования по контролю данного показателя отсутствуют (ОФС.1.8.1.0004.15). Подобная ситуация характерна и для других ведущих фармакопей мира, таких как Фармакопеи Японии, США и Великобритании [6]. В Европейской Фармакопее 11 и Государственной Фармакопее РФ XIV (ГФ РФ XIV) установлено минимальное требование к осмоляльности препаратов иммуноглобулина для внутривенного введения — не менее 240 мОсм/кг [5, 10].

Внимание к показателю «Осмоляльность» в отношении внутривенных иммуноглобулиновых препаратов определено большой вероятностью развития осложнений, связанных с изменением осмотического давления в кровотоке и, как следствие, нарушении функций крови [18]. Локальные нарушения осмотического давления могут привести к развитию системных изменений и развитию заболеваний, таких как гипергликемия, нефропатия, остеоартрит и др. [6, 17, 20]. Имеются сообщения и о том, что внутримышечное введение препаратов иммуноглобулинов с высокой осмоляльностью также сопряжено с риском. В частности, могут наблюдаться нежелательные последствия — боль в месте введения, а также более тяжелые анафилактические реакции [3, 11, 13, 14]. Клиническая значимость этого аспекта возрастает при введении больших доз препарата [19].

Учитывая обязательное использование антирабического иммуноглобулина в составе постэкспозиционной

профилактики бешенства, его контроль по показателю осмоляльности позволит снизить риски осложнений и повысить эффективность профилактики заболевания [9]. Необходимый объем введения препарата рассчитывают исходя из дозировки 40 МЕ на 1 кг массы тела пациента. Для человека массой от 60 до 90 кг этот объем соответствует значению от 16 до 25 мл при минимально разрешенном значении активности препарата 150 МЕ/мл.

Введение рассчитанной дозы антирабического иммуноглобулина осуществляется путем инфильтрации вокруг ран и в их глубине, поскольку это обеспечивает максимальную концентрацию препарата в зоне повреждения, где вирус бешенства наиболее активен. В ситуации, когда введение всего объема препарата невозможно из-за анатомической особенности раны (например, при повреждении кончиков пальцев или другие труднодоступные места), оставшуюся часть дозы вводят внутримышечно, предпочтительно в крупные мышцы (мышцы ягодиц, верхнюю часть бедра, предплечья).

Дополнительным стимулом для включения осмоляльности в перечень контролируемых показателей антирабического иммуноглобулина является процесс гармонизации национальных фармакопей с нормативными требованиями ЕАЭС. Это требует расширения номенклатуры показателей качества для гетерологичных иммуноглобулинов [15].

Выбор метода для определения осмоляльности зависит от физико-химических свойств и особенностей каждого препарата. Согласно ГФ РФ, XIV издания, для определения осмоляльности фармацевтических препаратов могут быть использованы мембранный, паровой и криоскопический методы [6]. Так, мембранная осмометрия основана на измерении осмотического давления на полупроницаемой мембране, селективно пропускающей молекулы веществ в зависимости от их размера. Этот метод целесообразно использовать для растворов, содержащих вещества с молекулярной массой более 300 кДа. Паровая осмометрия позволяет определить значение осмоляльности по разности температур паровых фаз раствора и чистого растворителя. Значение температуры паровой фазы зависит от концентрации кинетически активных молекул. При определении осмоляльности криоскопическим методом регистрируют различия температуры замерзания растворов в зависимости от концентрации его компонентов. К преимуществам этого метода следует отнести возможность исследования термолабильных субстанций, к которым относятся иммуноглобулиновые препараты. Криоскопический метод

позволяет измерять значения осмоляльности в широком диапазоне, не требует больших объемов образца и предварительной пробоподготовки [7, 8]. Результат измерения не зависит от атмосферного давления как, например, при использовании парового метода.

Таким образом, целью данной работы явилось исследование осмоляльности иммунобиологического лекарственного препарата (ИЛП) «Иммуноглобулин антирабический жидкий из крови лошади» криоскопическим методом, а также определение его основных валидационных характеристик для дальнейшего включения исследуемого показателя в спецификацию и нормативную документацию.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали коммерческие серии ИЛП «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий», произведённого ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора с действующим и истекшим сроком годности, а также его полуфабрикаты. Концентрация белка в препарате составляла от 9,0 до 9,5%, содержание глицина — от 2,0 до 2,5%. Глицин применялся в качестве стабилизатора.

Для определения осмоляльности использовали криоскопический метод, основанный на измерении понижения температуры замерзания раствора относительно чистого растворителя. Измерения проводились на осмометре Model 3250 версии 2.6 (Advanced Instruments, США). Испытуемые растворы объёмом 225 ± 25 мкл помещали в специальные пробирки и устанавливали в замораживающую камеру прибора. Диапазон измерений составлял от 0 до 2000 мОсм/кг. Перед началом исследований проводили калибровку прибора стандартными растворами с известной осмоляльностью в диапазоне от 290 до 3000 мОсм/кг (Advanced Instruments, США). Процесс измерения осуществлялся автоматически; результат фиксировался после достижения стабильной температуры пробы, о чём свидетельствовала команда на дисплее: «Osmolality XXX mOsm». Каждый образец исследовали не менее трёх раз.

Оценку валидационных характеристик метода проводили согласно рекомендациям общей фармакопейной статьи (ОФС) 1.1.0012 «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XV издания.

Для оценки линейности метода исследовали разведение препарата в диапазоне концентраций белка от 4 до 9%.

Для выявления влияния вспомогательных веществ на общее значение осмоляльности были проведены измерения образцов иммуноглобулина без добавления глицина, а также водных растворов глицина в концентрациях 2,0 мг/мл и 2,5 мг/мл, соответствующих нижнему и верхнему пределам его содержания в препарате.

Для установления допустимых пределов колебаний осмоляльности использовали карту индивидуальных значений Шухарта (X-карту). Оценка стабильности параметра проводилась в соответствии с требованиями стандарта ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015 [12]. Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2010.

Результаты и обсуждение

На начальном этапе исследования были определены значения осмоляльности для коммерческих серий препарата иммуноглобулина (рисунок 1). Полученные результаты соответствуют литературным данным [10]. Известно, что физиологически оптимальной считается осмоляльность, близкая к осмоляльности плазмы крови человека — 300 ± 30 мОсм/кг, поскольку такая величина обеспечивает наилучшую переносимость и минимальный риск побочных реакций. Для лекарственных препаратов, предназначенных для внутримышечного и подкожного введения, рекомендуемый верхний предел осмоляльности составляет до 600 мОсм/кг [19].

Среднее значение осмоляльности трёх серий препарата с действующим сроком годности составило $597 \pm 1,19$ мОсм/кг, дисперсия — 4,26, стандартное отклонение (S) — 2,06 мОсм/кг, коэффициент вариации (CV) — 0,35%, что свидетельствует о высокой воспроизводимости метода и низкой вариабельности результатов. Полученные данные подтверждают его пригодность для контроля качества препарата. В рамках исследования внутрилабораторной прецизионности метода осмоляльность определяли повторно в другой день другим исследователем (рисунок 2). Полученная вариабельность результатов находилась в пределах допустимого уровня ($RSD < 2,0\%$), что подтверждает надежность и воспроизводимость методики.

Для образцов с истекшим сроком годности отмечено постепенное увеличение осмоляльности. Для образцов, срок хранения которых превышает срок годности в несколько раз, также характерно заметное повышение значения осмоляльности. Данное обстоятельство может быть связано с процессами деградации компонентов

препарата, приводящими к изменению молекулярного состава, образованию новых кинетически активных частиц, таких как агрегированные молекулы и фрагменты гамма-глобулина [1, 3].

Для установления корреляции между осмоляльностью и концентрацией белка были подготовлены разведения препарата в диапазоне от 4,0 до 9,0%. Несмотря на установленные требования к содержанию белка в диапазоне от 9 до 11%, анализ многолетних данных (2016–2024) показал среднее значение $(9,39 \pm 0,06)\%$, что связано с технологическими особенностями производства — ограничениями пропускной способности используемых фильтрационных мембран для белковых молекул. В связи с этим образцы с концентрацией белка выше 9,0% не включали в дальнейший анализ.

Результаты представлены в виде точечной диаграммы с линией тренда (рисунок 3). Коэффициент детерминации составил $R^2=0,99$, что указывает на вы-

раженную линейную зависимость между концентрацией белка и осмоляльностью раствора. Эта закономерность согласуется с данными других исследований, демонстрирующими связь между концентрацией белковых компонентов и понижением температуры замерзания растворов иммуноглобулинов [8], а также влиянием общего состава раствора на его осмотическую активность [13, 15].

Важно отметить, что осмоляльность зависит не только от концентрации активной фармацевтической субстанции, но и от суммарного содержания всех растворенных частиц, включая вспомогательные вещества и растворитель. Общая осмоляльность является более информативным показателем, чем концентрация одного лишь активного ингредиента, и определяет общее воздействие на клетки и ткани организма [7, 17]. Избыточное количество вспомогательных компонентов может привести к гиперосмоляльности раствора и вызвать нежелательные побочные эффекты.

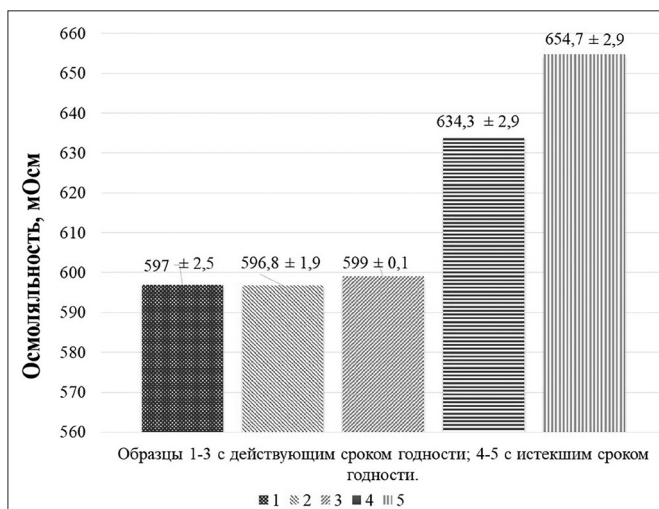


Рис. 1. Результаты определения осмоляльности иммуноглобулина антирабического

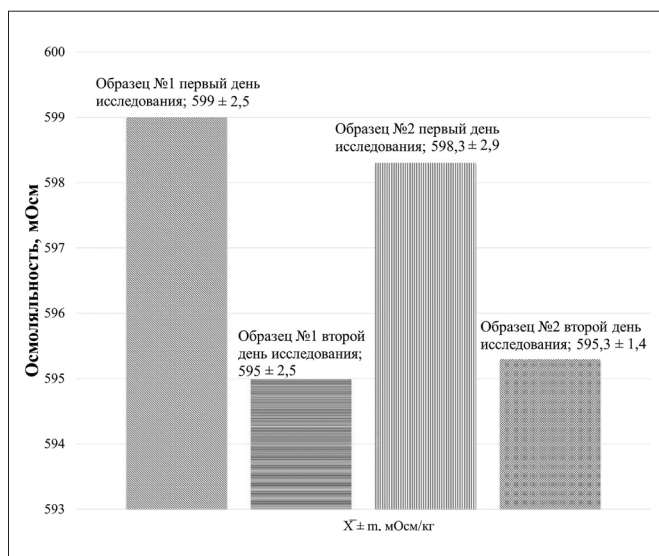


Рис. 2. Результаты внутрिलाбораторной прецизионности метода исследования иммуноглобулина антирабического

Для оценки влияния вспомогательных веществ на осмоляльность проведено сравнение образцов препарата, взятых до добавления глицина, и водных растворов глицина в концентрациях 2,0 и 2,5 мг/мл, соответствующих нижнему и верхнему пределам содержания в препарате. Абсолютный прирост осмоляльности за счёт глицина составил 65 мОсм/кг (рисунок 4), что подтверждает возможность регулирования этого параметра изменением количества стабилизатора.

В целях реализации риск-ориентированного подхода к обеспечению качества антирабического иммуноглобулина, контроль осмоляльности осуществлялся не только на этапе контроля готового препарата, но и на различных стадиях производственного процесса. Определение показателя

проводили на различных этапах фильтрации препарата. Фильтрация препарата представляет собой каскад баромембранных процессов, включающий стадии удаления частиц до 0,45 нм, диализ, удаление пирогенов и стерилизующую фильтрацию. Фильтрацию препарата проводят дважды, второй цикл осуществляют не менее чем через 42 суток, необходимых для выдержки и стабилизации препарата [2]. После первой стадии среднее значение осмоляльности составило $599 \pm 0,1$ мОсм/кг. Анализ полуфабриката после второго этапа фильтрации показал значение осмоляльности $595 \pm 1,3$ мОсм/кг, что говорит о незначительном снижении показателя примерно на 4 мОсм/кг. Наибольшее влияние на осмоляльность оказала стадия добавления стабилизатора после диализа во время первого цикла фильтрации.

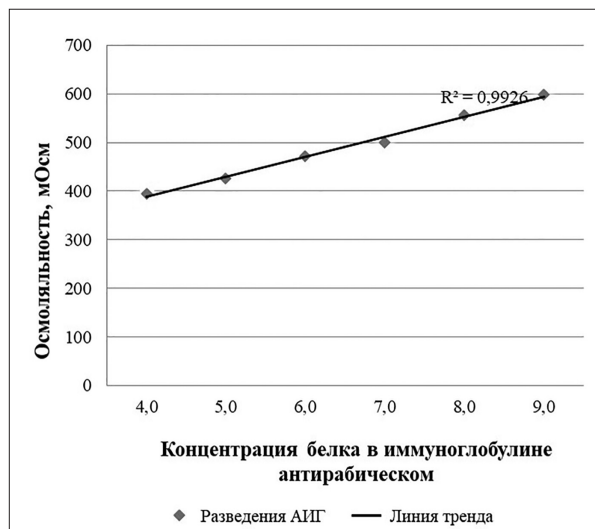


Рис. 3. Линейная зависимость значения осмоляльности от концентрации белка в иммуноглобулине антирабическом

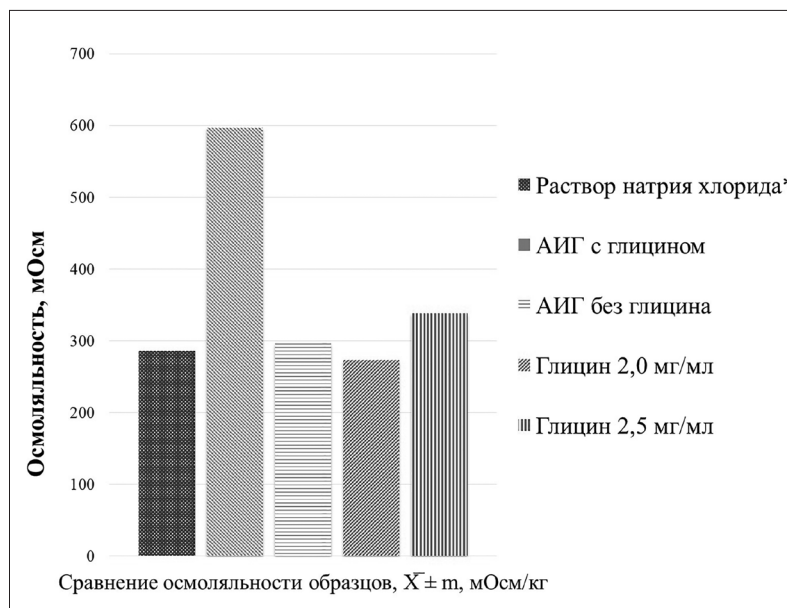


Рис. 4. Результаты определения осмоляльности иммуноглобулина антирабического без добавления стабилизатора (глицина) и проб водного раствора глицина. *Примечание:* * — по литературным данным [ОФС.1.2.1.0003.15]

Для оценки стабильности процесса использовали контрольные карты Шухарта (рисунки 5 и 6). Анализ контрольных карт скользящих размахов (R_m -карта) и индивидуальных значений (X -карта) показал, что процесс находится в статистически управляемом состоянии: наблюдаемые значения случайным образом распределены относительно центральной линии и не выходят за пределы $\pm 2\sigma$ (уровень тревоги). Это позволяет прогнозировать поведение показателя в будущем. Коэффициент вариации (CV) составил 0,39% и стандартное отклонение (S) – 2,4 мОсм/кг подтверждают высокую

воспроизводимость метода. Установлены контрольные границы: верхняя (UCL) – 602,9 мОсм/кг, нижняя (LCL) – 591,1 мОсм/кг, соответствующие уровню $\pm 3\sigma$ (уровень действий). Следует отметить, что верхняя контрольная граница превышает рекомендованное значение осмоляльности для препаратов, предназначенных для внутримышечного введения. Полученные данные могут быть использованы для установления допустимых пределов осмоляльности в нормативной документации. Для дальнейшей верификации необходимы дополнительные исследования и накопление статистических данных.

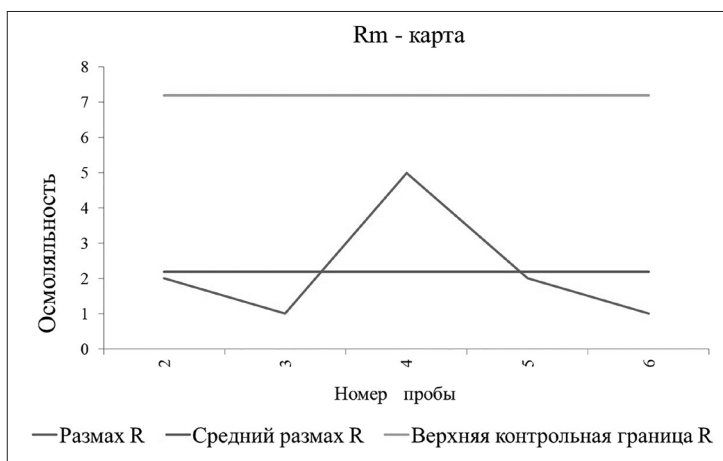


Рис. 5. Карта скользящих размахов

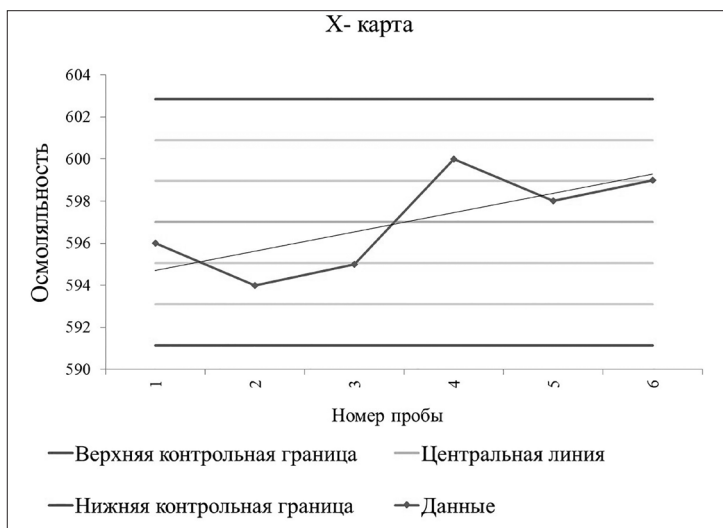


Рис. 6. Карта индивидуальных значений

Заключение

На основании полученных данных, метод может быть признан пригодным и надежным для проведения контрольных испытаний осмоляльности готового препарата иммуноглобулина антирабического, полученного из сыворотки крови лошади. Результаты проведенных валидационных исследований демонстрируют, что рас-

сматриваемый криоскопический метод определения осмоляльности обладает удовлетворительной повторяемостью, внутрилабораторной прецизионностью и линейностью. Важным преимуществом метода является требуемый малый объем образца (200–250 мкл) и отсутствие необходимости в предварительной пробоподготовке, что делает его экономичным и удобным в применении для экспресс-анализа. Применение контрольных карт Шу-

харта позволило оценить стабильность производственного процесса и установить допустимые пределы колебаний осмоляльности. Контроль осмоляльности целесообразно осуществлять на всех ключевых стадиях производства, включая этапы фильтрации и добавления стабилизатора.

Литература

- Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Киреев М.Н., Кочкалова Н.Н., Генералов С.В., Селезнева А.Г., Савицкая Л.В., Иванов Ю.В. Определение молекулярных параметров препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина методом гель-фильтрации // Проблемы особо опасных инфекций. — 2010. — № 4(106). — С. 54–57.
- Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Лобовикова О.А., Еремин С.А., Васин Ю.Г., Михеева Т.А., Жулидов И.М., Минаева Л.Н., Галкина М.В., Савицкая Л.В., Селезнева А.Г., Свинцов Р.А., Генералов С.В., Шульгина И.В. Производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина — итоги первых пяти лет // Проблемы особо опасных инфекций. — 2010. — № 3(105). — С. 58–62.
- Генералов С.В., Савенкова А.А., Киреев М.Н., Киреев М.Н., Абрамова Е.Г., Шульгина И.В., Лобовикова О.А. Оценка молекулярных параметров иммуноглобулина антирабического методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Биомедицина. — 2024. — Т. 20. — № 4. — С. 8–17.
- ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта. — Москва: Стандартинформ, 2015. — 46 с.
- Иммуноглобулин человеческий нормальный для внутривенного введения 04/2016:0918. Разработана на основе монографии Европейской Фармакопеи «Human normal immunoglobulin for subcutaneous administration (0918)». — Минздрав Республики Беларусь, 2016 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.rceth.by/Documents/3mz9drN22120160321.pdf> (дата обращения 20.03.26).
- Ковалёва Е.Л., Шестакова А.К., Архипова К.С., Полтева Л.В. Требования к качеству жидких лекарственных препаратов по показателю «Осмоляльность» // Фармация. — 2022. — Т. 71. — № 1. — С. 17–25.
- Кудашева Э.Ю., Исрафилов А.Г., Кудашева Г.Б., Сахобутдиновна Э.Т. Осмоляльность препарата иммуновенин // Трансфузиология. — 2005. — Т. 6. — № 1. — С. 40–44.
- Миняева О.А., Симонян Е.В., Евсельева Е.А., Позднякова Е.С., Музафарова А.Р., Саядгалина О.Т. Совершенствование способов контроля качества белка в препаратах иммуноглобулина // Современные проблемы науки и образования. — 2014. — № 1. — С. 364.
- Мовсесянц А.А., Бутырский А.Ю., Бондарев В.П., Олефир Ю.В., Постнова Е.Л., Мухачева А.В. К вопросу о применении гетерологичного антирабического иммуноглобулина для специфической профилактики бешенства у людей // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2015. — Т. 14. — № 5. — С. 85–89.
- Патент № 2339401 С2 Российская Федерация, МПК А61К 39/205, А61К 39/395, А61К35/16. Препарат гетерологичного антирабического иммуноглобулина для внутривенного и внутримышечного введения и способ его получения. № 2006141874/15. заявл. 28.11.2006. опубл. 27.11.2008 / Н.П. Ситник, А.Г. Исрафилов, Н.В. Загидуллин, М.М. Алсынбаев, Р.Х. Тимербаева; заявитель ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России — 12 с.
- Патент № 2749953 С2 Российская Федерация, МПК А61К 9/00, А61К 9/08, А61К 47/18. Высококонцентрированная композиция иммуноглобулина для фармацевтического применения. № 2018146817. заявл. 12.06.2017. опубл. 21.06.2021 / К. Арер, В. Каар, У. Ресслъ. заявитель ОКТАФАРМА АГ. — 25 с.
- Стрелков Н.С., Уракова Н.А. Фармацевтическая агрессия лекарств при инъекциях // Медицинский вестник Башкортостана. — 2013. — Т. 8. — № 3. — С. 96–100.
- Ураков А.Л., Уракова Н.А., Ловцова Л.В., Сорокина Ю.А., Занозина О.В. Осмотическая активность и безопасность инъекционных форм нестероидных противовоспалительных препаратов // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2018. — Т. 81. — № 10. — С. 15–19.
- Ураков А.Л., Уракова Н.А., Шубина Э.В., Ловцова Л.В., Самородов А.В., Гуревич К.Г., Столяренко А.П., Корунас В.И., Липатов Д.О., Муминов Д.Д. Гипертоническая активность растворов для инъекций может являться причиной постинъекционных осложнений (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. — 2023. — Т. 12. — № 2. — С. 164–173.
- Устинникова О.Б., Цербаченко И.М., Колесникова О.Н., Макарищева Д.Д., Исакина Ю.Е., Рунова О.Б. Перспективные вопросы оценки физико-химических показателей качества иммунобиологических лекарственных препаратов в условиях формирования регуляторной системы ЕАЭС // Биомедицина. — 2024. — Т. 20. — № 3Е. — С. 117–128.
- Abolhassani H., Asgardoost M.H., Rezaei N., Hammarstrom L., Aghamohammadi A. Different brands of intravenous immunoglobulin for primary immunodeficiencies: how to choose the best option for the patient? // Expert. Rev. Clin. Immunol. — 2015. — Vol. 11. — No. 11. — P. 1229–1243.
- Grattoni A., Merlo M., Ferrari M. Osmotic pressure beyond concentration restrictions // J. Phys. Chem. — 2007. — Vol. 111. — No. 40. — P. 11770–11775.
- Stein M.R. The new generation of liquid intravenous immunoglobulin formulations in patient care: a comparison of intravenous immunoglobulins // Postgrad. Med. — 2010. — Vol. 122. — No. 5. — P. 176–184.

19. Wang W. Tolerability of hypertonic injectables // *Int. J. Pharmaceut.* — 2015. — Vol. 490. — No. 1–2. — P. 308–315.
20. Zheng S., Li Y., Shao Y., Li L., Song F. Osmotic Pressure and Its Biological Implications // *Int. J. Mol. Sci.* — 2024. — Vol. 25. — No. 6. — Art. 3310. doi: 10.3390/ijms25063310.

References

- Abramova YeG, Nikiforov AK, Kireyev MN, Kochkalova NN, Generalov SV, Selezneva AG, Savitskaya LV, Ivanov YuV. Opredeleniye molekulyarnykh parametrov preparata geterologichnogo antirabicheskogo immunoglobulina metodom gel'-fil'tratsii. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2010; 4(106):54–57 (in Russian).
- Abramova EG, Nikiforov AK, Lobovikova OA, Eremin SA, Vasin YuG, Mikheeva TA, Zhulidov IM, Minaeva LN, Galkina MV, Savitskaya LV, Selezneva AG, Svintsov RA, Generalov SV, Shulgina IV. Proizvodstvo geterologichnogo antirabicheskogo immunoglobulina — itogi pervykh pyati let. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* 2010; 3(105):58–62 (in Russian).
- Generalov SV, Savenkova AA, Kireyev MN, Kireyev MN, Abramova YeG, Shul'gina IV, Lobovikova OA. Otsenka molekulyarnykh parametrov immunoglobulina antirabicheskogo metodom vysokoeffektivnoy zhidkostnoy khromatografii. *Biomeditsina* 2024; 20(4):8–17 (in Russian).
- GOST R ISO 7870-2-2015. Statisticheskiye metody. Kontrol'nyye karty. Chast' 2. Kontrol'nyye karty Shukharta. Moscow: Standartinform, 2015: 46 (in Russian).
- Immunoglobulin chelovecheskiy normal'nyy dlya vnutrivennogo vvedeniya 04/2016:0918. Razrabotana na osnove monografii Yevropeyskoy Farmakopei «Human normal immunoglobulin for subcutaneous administration (0918)». Minzdrav Respubliki Belarus', 2016. URL: <https://www.rceth.by/Documents/3mz9drN22120160321.pdf> (date of access 20.03.26) (in Russian).
- Kovalova YeL, Shestakova AK, Arkhipova KS, Polteva LV. Trebovaniya k kachestvu zhidkikh lekarstvennykh preparatov po pokazatelyu «Osmolyal'nost'». *Farmatsiya* 2022; 71(1):17–25 (in Russian).
- Kudasheva EYu, Israfilov AG, Kudasheva GB, Sakhabutdinovna ZT. Osmolyal'nost' preparata immunovenin. *Transfuziologiya* 2005; 6(1):40–44 (in Russian).
- Minyayeva OA, Simonyan YeV, Yevsel'yeva YeA, Pozdnyakova YeS, Muzafarova AR, Sayedgalina OT. Sovershenstvovaniye sposobov kontrolya kachestva belka v preparatakh immunoglobulina. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya* 2014; 1: 364 (in Russian).
- Movsesyants AA, Butyrskiy AYU, Bondarev VP, Olefir YuV, Postnova YeL, Mukhacheva AV. K voprosu o primeneniі geterologichnogo antirabicheskogo immunoglobulina dlya spet-sificheskoy profilaktiki beshenstva u lyudey. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika* 2015; 14(5):85–89 (in Russian).
- Patent № 2339401 S2 Rossiyskaya Federatsiya, MPK A61K 39/205, A61K 39/395, A61K35/16. Preparat geterologichnogo antirabicheskogo immunoglobulina dlya vnutrivennogo i vnutrimyshechnogo vvedeniya i sposob yego polucheniya. № 2006141874/15. zayavl 28.11.2006. opubl 27.11.2008. NP Sitnik, AG Israfilov, NV Zagidullin, MM Alsynbayev, RKh Timerbayeva; zayavitel' FGUP «NPO «Mikrogen» Minzdrava Rossii, 12 p (in Russian).
- Patent № 2749953 C2 Rossiyskaya Federatsiya, MPK A61K 9/00, A61K 9/08, A61K 47/18. Vysokokontsentrirrovannaya kompozitsiya immunoglobulina dlya farmatsevticheskogo primeneniya. № 2018146817. zayavl 12.06.2017. opubl 21.06.2021. K Arer, V Kaar, U Ressel'. zayavitel' OKTAFARMA AG, 25 p (in Russian).
- Strelkov NS, Urakova NA. Farmatsevticheskaya agressiya lekarstv pri in»yektsiyakh. *Meditinskiy vestnik Bashkortostana* 2013; 8(3):96–100 (in Russian).
- Urakov AL, Urakova NA, Lovtsova LV, Sorokina YuA, Zanozina OV. Osmoticheskaya aktivnost' i bezopasnost' in»yektsionnykh form nesteroidnykh protivovospalitel'nykh preparatov. *Ekspertimetal'naya i klinicheskaya farmakologiya* 2018; 81(10):15–19 (in Russian).
- Urakov AL, Urakova NA, Shubina Z V, Lovtsova LV, Samorodov AV, Gurevich KG, Stolyarenko AP, Korunas VI, Lipatov DO, Muminov DD. Gipertonicheskaya aktivnost' rastvorov dlya in'yektsiy mozhnet yavlyat'sya prichinoy postin»yektsionnykh oslozhneniy (obzor). *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* 2023; 12(2):164–173 (in Russian).
- Ustinnikova OB, Shcherbachenko IM, Kolesnikova ON, Makarishcheva DD, Isakina YuYe, Runova OB. Perspektivnyye voprosy otsenki fiziko-khimicheskikh pokazateley kachestva immunobiologicheskikh lekarstvennykh preparatov v usloviyakh formirovaniya regul'yatornoy sistemy YEAES. *Biomeditsina* 2024; 20(3E):117–128 (in Russian).
- Abolhassani H, Asgardoon MH, Rezaei N, Hammarstrom L, Aghamohammadi A. Different brands of intravenous immunoglobulin for primary immunodeficiencies: how to choose the best option for the patient? *Expert Rev Clin Immunol* 2015; 11(11):1229–1243.
- Grattoni A, Merlo M, Ferrari M. Osmotic pressure beyond concentration restrictions. *J Phys Chem* 2007; 111(40):11770–11775.
- Stein MR. The new generation of liquid intravenous immunoglobulin formulations in patient care: a comparison of intravenous immunoglobulins. *Postgrad Med* 2010; 122(5):176–184.
- Wang W. Tolerability of hypertonic injectables. *Int J Pharmaceut* 2015; 490(1)–2:308–315.
- Zheng S, Li Y, Shao Y, Li L, Song F. Osmotic Pressure and Its Biological Implications. *Int J Mol Sci* 2024; 25(6):3310. doi: 10.3390/ijms25063310.

OSMOLALITY AS A CRITICAL PARAMETER OF THE QUALITY AND SAFETY OF ANTIRABIES IMMUNOGLOBULIN

A.A. SAVENKOVA¹, S.V. GENERALOV¹, E.G. ABRAMOVA^{1,2}, YU.A. FOMINA³,
A.G. SELEZNEVA¹, I.V. SHULIGINA¹, O.A. LOBOVIKOVA¹, A.K. NIKIFOROV^{1,2}

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

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

³*Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov*

In order to ensure the proper quality of anti-rabies immunoglobulin, it is necessary to implement effective quality control methods at all stages of production, including the release of the finished product. The introduction of the osmolality indicator, determined by the cryoscopic method, into the specification is aimed at reducing the risk of adverse post-injection reactions and, as a result, improving the safety and tolerability of the drug for the patient.

Keywords: anti-rabies immunoglobulin; quality control; osmolality; cryoscopic method.

Address:

Savenkova A.A.

junior research associate, Department of standardization,
quality and metrology, Russian Anti-Plague Institute

«Microbe» of Rospotrebnadzor

E-mail: savencova.vita@gmail.com

Для цитирования:

Савенкова А.А., Генералов С.В., Фомина Ю.А., Абрамова Е.Г., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Селезнева А.Г., Никифоров А.К. Осмоляльность как критический параметр качества и безопасности антирабического иммуноглобулина. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2026; 22(1):26–34.

For citation:

Savenkova A.A., Generalov S.V., Abramova E.G., Fomina Yu.A., Selezneva A.G., Shuligina I.V., Lobovikova O.A., Nikiforov A.K. Osmolality as a critical parameter of the quality and safety of antirabies immunoglobulin. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2026; 22(1):26–34 (in Russian).

ЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИОФАГОВ *ENTEROBACTER* spp. В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИЯХ РОССИИ И ВЬЕТНАМ

Л.В. КАТАЕВА*, А.А. ВАКАРИНА, Н.Ф. КАРПУХИНА,
О.В. ПОСОЮЗНЫХ, К.Б. СТЕПАНОВА

ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии»
Роспотребнадзора, г. Тюмень

Угроза глобального распространения штаммов, обладающих множественной устойчивостью к антимикробным препаратам, на сегодняшний день стоит особенно остро. Бактериофаги и препараты на их основе являются альтернативным решением вопроса. Подбор производственных бактериофагов с широким спектром действия является одним из важных этапов для создания лекарственных средств. Целью исследования явилось изучение литических свойств экспериментальных серий бактериофагов *Enterobacter* spp. в отношении возбудителей бактериальных инфекций, циркулирующих на территориях России и Вьетнама. Изучение литических свойств бактериофагов *Enterobacter* spp. осуществлялось методом «spot-test». Установлена более высокая активность бактериофагов в отношении бактерий, изолированных с территорий, соответствующих месту выделения бактериофага. Выявлены штаммы бактериофагов, перспективные для дальнейшего использования в Российской Федерации в качестве диагностических, профилактических и лечебных препаратов. Эффективность представленного фагового коктейля составила 58%.

Ключевые слова: бактериофаги; *Enterobacter* spp.; антибиотикорезистентность; литические свойства бактериофагов; Социалистическая Республика Вьетнам.

Введение

Бактерии рода *Enterobacter* spp. характеризуются множеством экологических ниш обитания. Они широко распространены в воде, почве, являются фитопатогенами и обнаруживаются в составе нормобиоты кишечника человека и животных [9].

В настоящее время род *Enterobacter* spp. представлен 23 видами бактерий [21]. Несмотря на современные достижения молекулярно-генетических методов, таксономия бактерий *Enterobacter* spp. оставляет еще нерешенные задачи. Известно, что методы масс-спектрометрии, молекулярного секвенирование гена 16S рРНК, секвенирование маркерного гена *hsp60* предполагают дальнейшее обсуждение систематизации рода, особенно по видовой дифференцировке комплекса

Enterobacter cloacae. Сегодня комплекс *Enterobacter* включает: *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. pasteurii*, *E. xiangfangensis*, *E. bugandensis*, *E. cancerogenous*, *E. chengduensis*, *E. chuandaensis*, *E. sichuanensis* и *E. roggenkampii*. Имеются основания полагать, что метод ПЦР в реальном времени с амплификацией гена *dnaJ* будет одним из вариантов более точного метода систематизации этого рода [9, 16, 22].

Всемирной организацией здравоохранения бактерии рода *Enterobacter* spp. отнесены в группу «приоритетного статуса» ESKAPE-патогенов, обладающих потенциалом вызывать инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи [26]. Подвижность бактерий, способность образовывать биопленки, секретировать энтеротоксины, альфа-гемолизины, цитотоксины (аналогичные шига-подобным), наличие генов, кодирующих сидерофоры, способность к адгезии и инвазии в клетки хозяев, являются важным аспектом вирулентности и патогенности *Enterobacter* spp. [9]. По данным исследований *Enterobacter* spp. занимает третье место по распространенности среди микроорганизмов, вызывающих нозокомиальные инфекции, и второе место по устойчивости к β -лактамам антибиотикам. Они являются

© 2026 г. Катаева Л.В., Вакарина А.А., Карпухина Н.Ф., Посоюзных О.В., Степанова К.Б.

* Автор для переписки:

Катаева Любовь Владимировна

д.м.н., руководитель группы клинической бактериологии, главный научный сотрудник ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора
E-mail: kataevalv@tniikp.rosпотребнадзор.ru

универсальными носителями типов генов, продуцирующих β -лактамазы расширенного спектра (TEM, SHV, CTX-M и др.) и карбапенемазы (OXA-48, VIM, IMP, KPC, NDM-1 и др.). Кроме того, описаны и другие гены устойчивости, такие как: *qnrA1*, *aadB*, *aadA2*, *sukK* и *sat*. Сообщается, что *E. hormaechei* является наиболее вирулентным видом данного рода за счет наличия островков высокой патогенности, которые часто обнаруживаются на его хромосоме [5, 18].

Быстрые темпы роста антибиотикорезистентности штаммов вызывают особый интерес к поиску новых активных лекарственных препаратов в отношении рода *Enterobacter*, в том числе бактериофагов. Накопленная доказательная база сведений о свойствах бактериофагов указывает на перспективность их использования в лечебно-профилактической деятельности: высокий уровень специфичности вирионов в отношении своего круга хозяев; бактерицидное и бактериостатическое действие литических бактериофагов; активное размножение в присутствии бактериального хозяина; воздействие на антибиотикорезистентные штаммы бактерий; мутации бактерий, приводящие к их устойчивости к тому или иному фагу, происходят реже, чем к антибиотикам; биораспределение фага в различных органах организма человека и приемлемая себестоимость [2, 12, 14, 19, 28]. Известно о способности фагов лизировать и проникать в некоторые биопленки, о возможности вирионов адаптироваться и эволюционно изменять литические свойства в отношении фагоустойчивых штаммов [10]. Кроме того, фаги используют для доставки малых регуляторных РНК и переноса генов, участвующих в подавлении детерминант устойчивости бактерий к антимикробным препаратам [7].

С внедрением новых технологий расширяются горизонты знаний о механизмах взаимодействия бактерий и бактериофагов. Первый контакт между бактерией и бактериофагом происходит по средствам диффузии и броуновского движения, после чего устанавливается обратимое, неспецифическое связывание микроорганизмов посредством электростатических сил, за которым следует необходимое связывание между капсидным белком частицы фага и специфическими рецепторами на бактериальной поверхности. После связывания фага с бактериальной клеткой происходит проникновение вириона и выброс генетического материала [13]. Кроме встраивания ДНК/РНК вируса в геном бактериальной клетки литический эффект обеспечивают и фаговые литические ферменты, такие как эндолизины, пептидогликангидролазы [23] и другие. Известен лизогенный вариант коммуникации

бактерий и фагов за счет интеграз, транспозаз или сайтов геномного прикрепления (*att*) [24, 27].

В литературе представлены данные об чрезвычайно узком диапазоне активности *Enterobacter* бактериофагов в пределах своего вида, но также встречаются вирионы, способные ингибировать рост различных родов бактерий, таких как *Achromobacter xylosoxydans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leclercia* spp. и *Aeromonas hydrophila* [4, 6, 8, 11, 17, 20]. Существует мнение о пластичности литических свойств бактериофагов с изменением диапазона хозяев на протяжении времени [15]. Модификация процедур и условий роста может способствовать выделению новых фагов с более широким кругом хозяев [25].

Всесторонний подход к данным о взаимодействии комплекса «бактерия — бактериофаг» приводит к повышению требований выбора матричных бактериофагов, используемых для производства. С целью выделения новых бактериофагов необходимо изучать все более широкий пул вирионов, в том числе изолированных с различных территорий, для поиска вариантов, отвечающих критериям современных реалий.

Цель: изучить литические свойства экспериментальных серий бактериофагов *Enterobacter* в отношении возбудителей бактериальных инфекций, циркулирующих на территориях России и Вьетнама.

Материалы и методы

Для проведения исследований были использованы 3 экспериментальные серии бактериофагов и 100 штаммов бактерий рода *Enterobacter* spp. из коллекции ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора. Изучение литической активности осуществлялось методом «spot-test». Бактериофаги считали активными в случае оценки их свойств на «+++» и «++++» креста.

Бактериофаги *Enterobacter* (3-10, 4-6, 4-9) были изолированы из городских сточных вод города Тюмени методом обогащения с «подсевом» [1]. Титр бактериофагов составил 10^7 БОЕ/мл по Грациа. Для выделения и накопления вирионов использовались матричные бактериальные штаммы, которые были изучены на наличие генетических маркеров резистентности к гликопептидным и бета-лактамам антибиотикам с использованием набора реагентов БакРезиста GLA (ООО «ДНК-технология»).

Бактерии рода *Enterobacter* spp. были получены с объектов окружающей среды г. Тюмени (Российская

Федерация – РФ) и г. Ханой (Социалистическая Республика Вьетнам – СРВ): водопроводная вода, вода бассейнов, рыба и рыбная продукция, лечебная грязь, смывы с поверхностей предприятий общественного питания (таблица 1). Идентификация культур была проведена методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF Biotyper MicroFlex, Bruker, Германия) по белковым спектрам. Изоляты были изучены на резистентность к антимикробным препаратам диско-диффузионным методом. Использовались диски с ципрофлоксацином, амикацином, цефтазидимом, цефепимом, амоксициллин клавулановой кислотой, имипенемом и меропенемом.

$p < 0,05$. Проводился расчет 95% доверительного интервала (95% ДИ).

Результаты

Дизайн исследования основывался на изучении литических свойств бактериофагов *Enterobacter* spp. в отношении гомологичного рода бактерий. Для формирования выборки подобраны бактерии *Enterobacter cloacae* complex, изолированные с объектов окружающей среды различных территорий. Сравнение их антибиотикорезистентности, как одного из ведущих факторов патогенности, показало низкий уровень резистентности штаммов ко всем антимикробным препаратам (АМП), за исключением амоксициллина. Большая доля резистентных штаммов к препаратам пенициллиновой группы объясняется данными Российских рекомендаций «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» об ожидаемой резистентности бактерий *Enterobacter cloacae* complex [3]. При этом достоверных различий резистентности в отношении АМП, выделенных из г. Тюмень и г. Ханой, не выявлено (таблица 2).

Кроме того, для выделения и накопления вирионов использовались матричные бактериальные штаммы. Проведено изучение их антибиотикочувствительности к амикацину, цефтазидиму, цефепиму, амоксициллин клавулановой кислоте, имипенему и меропенему диско-диффузионным методом. Проанализирован генотипический профиль бактерий в отношении гликопептидных и бета-лактамных антибиотиков: VAN A\B (ванкомицину, тейкопланину); MEC A (метициллину, оксациллину); TEM, CTX-M-1, SHV (пенициллинам и цефалоспорином); OXA-40-LIKE, OXA-48-LIKE, OXA-23-LIKE, OXA-51-LIKE, IMP, KPC, GES, NDM, VIM (карбапенемам). Установлено отсутствие фено- и генотипической резистентности к антимикробным препаратам.

Таблица 1
Количество штаммов, используемых для определения литических свойств бактериофагов *Enterobacter* spp.

Видовой состав штаммов	Бактерии, выделенные с объектов внешней среды (г. Тюмень)	Бактерии, выделенные с объектов внешней среды (г. Ханой)
<i>E. cloacae</i>	26	26
<i>E. ludwigii</i>	12	1
<i>E. asburiae</i>	9	9
<i>E. kobei</i>	3	9
<i>E. hormaechei</i>	-	5
Всего	50	50

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программного обеспечения SPSS Statistics v.22. Сравнение данных осуществлялось с применением четырехпольных таблиц сопряженности с помощью критерия Хи-квадрат Пирсона. Статистически значимыми считали результаты

Таблица 2

Доля резистентных к АМП бактерий *Enterobacter cloacae* complex, изолированных с различных территорий

	% (95% ДИ)						
	ципрофлоксацин	амикацин	цефтазидим	цефепим	амоксициллин клавулановая кислота	имипенем	меропенем
РФ (г. Тюмень)	2,0 (0,1–10,7)	0	2,0 (0,1–10,7)	0	72,0 (57,5–83,8)	0	0
СРВ (г. Ханой)	6,0 (1,2–16,5)	2,0 (0,1–10,7)	6,0 (1,2–16,5)	0	88,0 (75,7–95,5)	2,0 (0,1–10,7)	0

Изучение литических свойств бактериофагов, выделенных из сточных вод города Тюмени, показало их активность в отношении бактериальных культур рода *Enterobacter*, изолированных из окружающей среды г. Тюмень, в 36,7% и лишь к 12,0% штаммов, полученных с объектов внешней среды г. Ханой. Применение фагового коктейля, представленного тремя бактериофагами, увеличило антибактериальное действие вирионов. Эффективность комплекса бактериофагов составила 58,0% к 29 штаммам бактерий *Enterobacter* spp., выделенных в г. Тюмени, и 20,0% к 10 штаммам г. Ханой.

Определение литической активности бактериофагов *Enterobacter* spp. к различным бактериям рода

Enterobacter представлено в таблицах 3 и 4. Установлена более высокая литическая активность фага 4-9 в сравнении с бактериофагом 4-6 (Хи-квадрат Пирсона – 4,244, $p=0,039$), в отношении бактерий, полученных в г. Тюмень. Кроме того, под действием данного фага зарегистрирован лизис 75% штаммов *E. ludwigii*, что достоверно выше количества лизированных бактерий *E. cloacae* (Хи-квадрат Пирсона – 5,371, $p=0,02$). Вероятнее всего, полученные результаты можно объяснить близким генетическим родством бактерий *Enterobacter cloacae* complex. Провести анализ литических свойств фагов в отношении различных видов бактерий, изолированных в СРВ, не представляется возможным, в связи с их низкой активностью.

Таблица 3

Литическая активность фагов *Enterobacter* в отношении *Enterobacter cloacae* complex, изолированных из окружающей среды РФ (г. Тюмень)

<i>Enterobacter cloacae</i> complex	Количество чувствительных бактерий / общее число изученных штаммов (доля чувствительных бактерий к бактериофагам, %)			
	Фаг 3-10	Фаг 4-6	Фаг 4-9	Фаговый коктейль
<i>E. cloacae</i>	9/26 (34,6)	7/26 (26,9)	9/26 (34,6)	12/26 (46,2)
<i>E. ludwigii</i>	6/12 (50,0)	6/12 (50,0)	9/12 (75,0)	9/12 (75,0)
<i>E. asburiae</i>	1/9 (11,1)	0/9	4/9 (44,4)	5/9 (55,6)
<i>E. kobei</i>	1/3 (33,3)	1/3 (33,3)	2/3 (66,7)	3/3 (100)
<i>E. hormaechei</i>	-	-	-	-
Всего	17/50 (34,0)	14/50 (28,0)	24/50 (48,0)	29/50 (58,0)

Таблица 4

Литическая активность фагов *Enterobacter* spp. в отношении *Enterobacter cloacae* complex, изолированных из окружающей среды СРВ (г. Ханой)

<i>Enterobacter cloacae</i> complex	Количество чувствительных бактерий / общее число изученных штаммов (доля чувствительных бактерий к бактериофагам, %)			
	Фаг 3-10	Фаг 4-6	Фаг 4-9	Фаговый коктейль
<i>E. cloacae</i>	2/26 (7,7)	3/26 (11,5)	0/26	3/26 (11,5)
<i>E. ludwigii</i>	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>E. asburiae</i>	2/9 (22,2)	2/9 (22,2)	2/9 (22,2)	3/9 (33,3)
<i>E. kobei</i>	2/9 (22,2)	2/9 (22,2)	2/9 (22,2)	4/9 (44,4)
<i>E. hormaechei</i>	0/5	1/5 (20,0)	0/5	0/5
Всего	6/50 (12,0)	8/50 (16,0)	4/50 (8,0)	10/50 (20,0)

Сравнение номинальных данных по литической активности фагов выявило достоверную разницу в эффективности антибактериального действия бактериофагов. Установлен более высокий литический потенциал бактериофагов к штаммам, циркулирующим на одно-

именной территории с вирионами (Хи-квадрат Пирсона – 24,784, $p=0,001$). При оценке комплексного действия фагового коктейля данный показатель составил 15,174 ($p=0,001$). Установленная закономерность обусловлена активностью бактериофагов 3-10 и 4-9 (таблица 5).

Анализ активности бактериофагов в отношении бактерий *Enterobacter cloacae complex* с различных территорий

<i>Enterobacter cloacae complex</i>	Количество / доля чувствительных бактерий к бактериофагам, %			
	Фаг 3-10	Фаг 4-6	Фаг 4-9	Фаговый коктейль
РФ (г. Тюмень)	17/34,0	14/28,0	24/48,0	29/58,0
СРБ (г. Ханой)	6/12,0	8/16,0	4/8,0	10/20,0
Хи-квадрат Пирсона	6,832	3,667	19,841	15,174
ρ	0,009*	0,056	0,001*	0,001*

Примечание: * – статистически достоверная разница

Для выделения бактериофагов были использованы выделенные из сточных вод штаммы *Enterobacter cloacae*, идентифицированные методом масс-спектрометрии. Вместе с тем установлено, что активность бактериофагов в отношении бактериальных культур *Enterobacter cloacae*, выделенных в г. Тюмень, составила от 26,9 до 34,6% случаев, для штаммов г. Ханой –

0–11,5%. Анализ данных с использованием таблиц сопряженности определил более высокую активность бактериофагов к штаммам, выделенным в г. Тюмень (Хи-квадрат – 16,5, $\rho=0,001$). Различия также были обусловлены фагами 3-10 и 4-9. Данная закономерность прослеживается и при изучении активности фагового коктейля (таблица 6).

Сравнительная характеристика литической активности фагов *Enterobacter cloacae* в отношении бактерий *Enterobacter cloacae*, выделенных на различных территориях

<i>Enterobacter cloacae</i>	Количество и доля чувствительных бактерий к бактериофагам, %			
	Фаг 3-10	Фаг 4-6	Фаг 4-9	Фаговый коктейль
РФ (г. Тюмень)	9/34,6	7/26,9	9/34,6	12/46,2
СРБ (г. Ханой)	2/7,7	3/11,5	0/0	3/11,5
Точный критерий Фишера	0,038*	0,291	0,002*	0,013*

Примечание: * – статистически достоверная разница

Заключение

Экспериментальная серия бактериофагов *Enterobacter* проявляла литическую активность в отношении различных видов бактерий *Enterobacter cloacae complex*, что объясняется генетическим родством изученных культур. Фаговый коктейль на их основе лизировал порядка 60% бактерий. На основании полученных результатов можно сделать вывод о целесообразности дальнейшего изучения вирионов для использования в диагностических и лечебных целях в Российской Федерации.

Сравнительный анализ элиминирования вирионами штаммов рода *Enterobacter*, изолированных с различных территорий, выявил более высокую активность бактериофагов к *Enterobacter cloacae complex*, так и к бактериям *Enterobacter cloacae*, циркулирующим на идентичной территории (г. Тюмень). Следовательно, оптимальным вариантом для выделения и идентификации бактериофагов является окружающая среда, где циркулируют данные патогены.

Литература

1. Васильев Д.А., Феоктистова Н.А., Алешкин А.В., Золотухин С.Н., Мاستиленко А.В., Киселева И.А., Сульдина Е.В., Никитченко Д.В. Разработка биотехнологических параметров создания бактериофаговых биопрепаратов для деконтаминации микрофлоры, вызывающей порчу пищевого сырья животного происхождения и мясных, рыбных, молочных продуктов (биопроцессинг): научная монография. – Ульяновск: ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, 2019. – 450 с.
2. Гумаюнова К.С., Зинина О.С., Овчинникова М.В., Гавевская Н.Е., Синягина Ю.В., Никифоров А.К. Оценка результатов испытаний экспериментального фага для диагностики холеры Эльтор // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2021. – Т. 17. – № 4. – С. 34–41.
3. Методические рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия 2024-02. МАКМАХ. – Смоленск: СГМУ, 2024. – 192 с.
4. Addablah A.Y.A., Kakou-Ngazona S., Akpa E.E., M'Bourou Ndombi F., Adioumani E., Koudou A., Coulibaly N'Golo

- D., Kouame Sina M., Kouassi S.K., Aoussi S., Dosso M. Investigation of Phages infecting *Escherichia coli* strains B and C, and *Enterobacter cloacae* in Sewage and Ebrié Lagoon, Côte d'Ivoire // *Phage (New Rochelle)*. — 2021. — Vol. 2. — No. 3. — P. 104–111.
5. Ali S.F., Teh S.H., Yang H.H., Tsai Y.C., Chao H.J., Peng S.S., Chen S.C., Lin L.C., Lin N.T. Therapeutic Potential of a Novel Lytic Phage, vB_EclM_ECLFM1, against Carbapenem-Resistant *Enterobacter cloacae* // *Int. J. Mol. Sci.* — 2024. — Vol. 25. — No. 2. — Art. 854. doi:10.3390/ijms25020854.
 6. Asif M., Naseem H., Alvi I.A., Basit A., Rehman S.U. Characterization of a lytic EBP bacteriophage with large size genome against *Enterobacter cloacae* // *APMIS*. — 2021. — Vol. 129. — No. 8. — P. 461–469.
 7. Azam A.H., Tan X.E., Veeranarayanan S., Kiga K., Cui L. Bacteriophage technology and modern medicine // *Antibiotics (Basel)*. — 2021. — Vol. 10. — No. 8. — Art. 999. doi:10.3390/antibiotics10080999.
 8. Cieřlik M., Harhala M., Orwat F., Dąbrowska K., Górski A., Jończyk-Matysiak E. Two newly isolated *Enterobacter*-specific bacteriophages: Biological properties and stability studies // *Viruses*. — 2022. — Vol. 14. — No. 7. — Art. 1518. doi:10.3390/v14071518.
 9. Davin-Regli A., Lavigne J.P., Pagès J.M. *Enterobacter* spp.: Update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2019. — Vol. 32, N 4. — e00002-19. doi:10.1128/CMR.00002-19.
 10. Divya Ganeshan S., Hosseinidoust Z. Phage therapy with a focus on the human microbiota // *Antibiotics (Basel)*. — 2019. — Vol. 8. — No. 3. — Art. 131. doi:10.3390/antibiotics8030131.
 11. Finney A.G., Perry J.M., Evans D.R., Westbrook K.J., McElheny C.L., Iovleva A., Doi Y., Shields R.K., Van Tyne D. Isolation and characterization of lytic bacteriophages targeting diverse *Enterobacter* spp. clinical isolates // *Phage (New Rochelle)*. — 2022. — Vol. 3. — No. 1. — P. 50–58.
 12. Haines M.E.K., Hodges F.E., Nale J.Y., Mahony J., van Sinderen D., Kaczorowska J., Alrashid B., Akter M., Brown N., Sauvageau D., Sicheritz-Pontén T., Thanki A.M., Millard A.D., Galyov E.E., Clokie M.R.J. Analysis of selection methods to develop novel phage therapy cocktails against antimicrobial resistant clinical isolates of bacteria // *Front. Microbiol.* — 2021. — Vol. 12. — Art. 613529. doi:10.3389/fmicb.2021.613529.
 13. Harada L.K., Silva E.C., Campos W.F., Del Fiol F.S., Vila M., Dąbrowska K., Krylov V.N., Balção V.M. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art // *Microbiol. Res.* — 2018. — Vol. 212–213. — P. 38–58.
 14. Hibstu Z., Belew H., Akelew Y., Mengist H.M. Phage therapy: A different approach to fight bacterial infections // *Biologics*. — 2022. — Vol. 16. — P. 173–186.
 15. Manohar P., Tamhankar A.J., Lundborg C.S., Nachimuthu R. Therapeutic characterization and efficacy of bacteriophage cocktails infecting *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter* species // *Front. Microbiol.* — 2019. — Vol. 10. — Art. 574. doi:10.3389/fmicb.2019.00574.
 16. Mattioni Marchetti V., Kuka A., Piazza A., Gaiarsa S., Merla C., Sottosanti M., Cambieri P., Migliavacca R., Baldanti F. *Enterobacter asburiae* ST229: An emerging carbapenemases producer // *Sci. Rep.* — 2024. — Vol. 14. — Art. 6220. doi.org/10.1038/s41598-024-55884-y.
 17. Morozova V., Jdeed G., Kozlova Y., Babkin I., Tikunov A., Tikunova N. A new *Enterobacter cloacae* bacteriophage EC151 encodes the deazaguanine DNA modification pathway and represents a new genus within the siphoviridae family // *Viruses*. — 2021. — Vol. 13. — No. 7. — Art. 1372. doi:10.3390/v13071372.
 18. Mutai I.J., Juma A.A., Inyimili M.I., Nyachio A., Nyamache A.K. Efficacy of diversely isolated lytic phages against multi-drug resistant *Enterobacter cloacae* isolates in Kenya // *Afr. J. Lab. Med.* — 2022. — Vol. 11. — No. 1. — Art. 1673. doi:10.4102/ajlm.v11i1.1673.
 19. Nang S.C., Lin Y.W., Petrovic Fabijan A., Chang R.Y.K., Rao G.G., Iredell J., Chan H.K., Li J. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of phage therapy: A major hurdle to clinical translation // *Clin. Microbiol. Infect.* — 2023. — Vol. 29. — No. 6. — P. 702–709.
 20. Nasr-Eldin M.A., Gamal E., Hazza M., Abo-Elmaaty S.A. Isolation, characterization, and application of lytic bacteriophages for controlling *Enterobacter cloacae* complex (ECC) in pasteurized milk and yogurt // *Folia Microbiol. (Praha)*. — 2023. — Vol. 68. — No. 6. — P. 911–924.
 21. National library of medicine (national Center for Biotechnology information). — URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/tree/?taxon=547> (date of access: 05.12.2024)
 22. Qiu X., Ye K., Ma Y., Zhao Q., Wang L., Yang J. Genome sequence-based species classification of *Enterobacter cloacae* complex: A study among clinical isolates // *Microbiol. Spectr.* — 2024. — Vol. 12. — No. 6. — e04312-23. doi:10.1128/spectrum.04312-23.
 23. Ranveer S.A., Dasriya V., Ahmad M.F., Dhillon H.S., Samtiya M., Shama E., Anand T., Dhewa T., Chaudhary V., Chaudhary P., Behare P., Ram C., Puniya D.V., Khedkar G.D., Raposo A., Han H., Puniya A.K. Positive and negative aspects of bacteriophages and their immense role in the food chain // *NPJ Sci. Food*. — 2024. — Vol. 8. — No. 1. — Art. 1. doi:10.1038/s41538-023-00245-8.
 24. Reuter M., Kruger D.H. Approaches to optimize therapeutic bacteriophage and bacteriophage-derived products to combat bacterial infections // *Virus Genes*. — 2020. — Vol. 56. — No. 2. — P. 136–149.
 25. Ross A., Ward S., Hyman P. More is better: selecting for broad host range bacteriophages // *Frontiers in microbiology*. — 2016. — Vol. 7. — Art. 1352. doi:10.3389/fmicb.2016.01352.

26. Stepanova T.F., Kataeva L.V., Posoyuznykh O.V., Bogun A.G., Kislichkina A.A., Tran T.N. The structure of ESKAPE pathogens isolated from patients of the neonatal intensive care unit at the National Hospital of Pediatrics in Hanoi, the Socialist Republic of Vietnam // *J. Microbiol. Epidemiol. and Immunobiol.* — 2023. — Vol. 100. — No. 2. — P. 168–177.
27. Turner D., Adriaenssens E.M., Tolstoy I., Kropinski A.M. Phage annotation guide: Guidelines for assembly and high-quality annotation // *Phage.* — 2021. — Vol. 2. — No. 4. — P. 170–182.
28. Zalewska-Piątek B. Phage Therapy-Challenges, Opportunities and Future Prospects // *Pharmaceuticals (Basel).* — 2023. — Vol. 16. — No. 12. — Art. 1638. doi:10.3390/ph16121638.

References

1. Vasil'yev DA, Feoktistova NA, Aleshkin AV, Zolotukhin SN, Mastilenko AV, Kiseleva IA, Sul'dina YeV, Nikitchenko DV. Razrabotka biotekhnologicheskikh parametrov sozdaniya bakteriofagovykh biopreparatov dlya dekontaminatsii mikroflory, vyzhyvayushchey porchu pishchevogo syr'ya zhivotnogo proiskhozhdeniya i myasnykh, rybnykh, molochnykh produktov (bioprotsessing): nauchnaya monografiya. Ul'yanovsk: FGBOU VO Ul'yanovskiy GAU, 2019: 450 (in Russian).
2. Gumayunova KS, Zinina OS, Ovchinnikova MV, Gayevskaya NYe, Sinyagina YuV, Nikiforov AK. Otsenka rezul'tatov ispytaniy eksperimental'nogo faga dlya diagnostiki kholery El'tor. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova* 2021; 17(4):34–41 (in Russian).
3. Metodicheskiye rekomendatsii. Opredeleniye chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antimikrobnym preparatam. Versiya 2024-02. MAKMAKH. Smolensk: SGMU, 2024: 192 (in Russian).
4. Addablah AYA, Kakou-Ngazona S, Akpa EE, M'Bourou Ndombi F, Adioumani E, Koudou A, Coulibaly N'Golo D, Kouame Sina M, Kouassi SK, Aoussi S, Dosso M. Investigation of Phages infecting *Escherichia coli* strains B and C, and *Enterobacter cloacae* in Sewage and Ebrié Lagoon, Côte d'Ivoire. *Phage (New Rochelle)* 2021; 2(3):104–111.
5. Ali SF, Teh SH, Yang HH, Tsai YC, Chao HJ, Peng SS, Chen SC, Lin LC, Lin NT. Therapeutic Potential of a Novel Lytic Phage, vB_EclM_ECLFM1, against Carbapenem-Resistant *Enterobacter cloacae*. *Int J Mol Sci* 2024; 25(2):854. doi:10.3390/ijms25020854.
6. Asif M, Naseem H, Alvi IA, Basit A, Rehman SU. Characterization of a lytic EBP bacteriophage with large size genome against *Enterobacter cloacae*. *APMIS* 2021; 129(8):461–469.
7. Azam AH, Tan XE, Veerananarayanan S, Kiga K, Cui L. Bacteriophage technology and modern medicine. *Antibiotics (Basel)* 2021; 10(8):999. doi:10.3390/antibiotics10080999.
8. Cieřlik M, Harhala M, Orwat F, Dąbrowska K, Górski A, Jończyk-Matysiak E. Two newly isolated *Enterobacter*-specific bacteriophages: Biological properties and stability studies. *Viruses* 2022; 14(7):1518. doi:10.3390/v14071518.
9. Davin-Regli A, Lavigne JP, Pagès JM. *Enterobacter* spp.: Update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2019; 32(4):e00002-19. doi:10.1128/CMR.00002-19.
10. Divya Ganeshan S, Hosseinidoust Z. Phage therapy with a focus on the human microbiota. *Antibiotics (Basel)* 2019; 8(3):131. doi:10.3390/antibiotics8030131.
11. Finney AG, Perry JM, Evans DR, Westbrook KJ, McElheny CL, Iovleva A, Doi Y, Shields RK, Van Tyne D. Isolation and characterization of lytic bacteriophages targeting diverse *Enterobacter* spp. clinical isolates. *Phage (New Rochelle)* 2022; 3(1):50–58.
12. Haines MEK, Hodges FE, Nale JY, Mahony J, van Sinderen D, Kaczorowska J, Alrashid B, Akter M, Brown N, Sauvageau D, Sicheritz-Pontén T, Thanki AM, Millard AD, Galyov EE, Clokie MRJ. Analysis of selection methods to develop novel phage therapy cocktails against antimicrobial resistant clinical isolates of bacteria. *Front Microbiol* 2021; 12:613529. doi:10.3389/fmicb.2021.613529.
13. Harada LK, Silva EC, Campos WF, Del Fiol FS, Vila M, Dąbrowska K, Krylov VN, Balcão VM. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiol Res* 2018; 212–213:38–58.
14. Hibstu Z, Belew H, Akelew Y, Mengist HM. Phage therapy: A different approach to fight bacterial infections. *Biologics* 2022; 16:173–186.
15. Manohar P, Tamhankar AJ, Lundborg CS, Nachimuthu R. Therapeutic characterization and efficacy of bacteriophage cocktails infecting *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter* species. *Front Microbiol* 2019; 10:574. doi:10.3389/fmicb.2019.00574.
16. Mattioni Marchetti V, Kuka A, Piazza A, Gaiarsa S, Merla C, Sottosanti M, Cambieri P, Migliavacca R, Baldanti F. *Enterobacter asburiae* ST229: An emerging carbapenemases producer. *Sci Rep* 2024; 14:6220. doi.org/10.1038/s41598-024-55884-y.
17. Morozova V, Jdeed G, Kozlova Y, Babkin I, Tikunov A, Tikunova N. A new *Enterobacter cloacae* bacteriophage EC151 encodes the deazaguanine DNA modification pathway and represents a new genus within the siphoviridae family. *Viruses* 2021; 13(7):1372. doi:10.3390/v13071372.
18. Mutai IJ, Juma AA, Inyimili MI, Nyachieo A, Nyamache AK. Efficacy of diversely isolated lytic phages against multi-drug resistant *Enterobacter cloacae* isolates in Kenya. *Afr J Lab Med* 2022; 11(1):1673. doi:10.4102/ajlm.v11i1.1673.
19. Nang SC, Lin YW, Petrovic Fabijan A, Chang RYK, Rao GG, Iredell J, Chan HK, Li J. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of phage therapy: A major hurdle to clinical translation. *Clin Microbiol Infect* 2023; 29(6):702–709.
20. Nasr-Eldin MA, Gamal E, Hazza M, Abo-Elmaaty SA. Isolation, characterization, and application of lytic bacterio-

- phages for controlling *Enterobacter cloacae* complex (ECC) in pasteurized milk and yogurt. *Folia Microbiol (Praha)* 2023; 68(6):911–924.
21. National library of medicine (national Center for Biotechnology information). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/tree/?taxon=547> (date of access: 05.12.2024)
 22. Qiu X, Ye K, Ma Y, Zhao Q, Wang L, Yang J. Genome sequence-based species classification of *Enterobacter cloacae* complex: A study among clinical isolates. *Microbiol Spectr* 2024; 12(6):e04312-23. doi:10.1128/spectrum.04312-23.
 23. Ranveer SA, Dasriya V, Ahmad MF, Dhillon HS, Samtiya M, Shama E, Anand T, Dhewa T, Chaudhary V, Chaudhary P, Behare P, Ram C, Puniya DV, Khedkar GD, Raposo A, Han H, Puniya AK. Positive and negative aspects of bacteriophages and their immense role in the food chain. *NPJ Sci Food* 2024; 8(1):1. doi:10.1038/s41538-023-00245-8.
 24. Reuter M, Kruger DH. Approaches to optimize therapeutic bacteriophage and bacteriophage-derived products to combat bacterial infections. *Virus Genes* 2020; 56(2):136–149.
 25. Ross A, Ward S, Hyman P. More is better: selecting for broad host range bacteriophages. *Frontiers in microbiology* 2016; 7:1352. doi:10.3389/fmicb.2016.01352.
 26. Stepanova TF, Kataeva LV, Posoyuznykh OV, Bogun AG, Kislichkina AA, Tran TN. The structure of ESKAPE pathogens isolated from patients of the neonatal intensive care unit at the National Hospital of Pediatrics in Hanoi, the Socialist Republic of Vietnam. *J Microbiol Epidemiol and Immunobiol* 2023; 100(2):168–177.
 27. Turner D, Adriaenssens EM, Tolstoy I, Kropinski AM. Phage annotation guide: Guidelines for assembly and high-quality annotation. *Phage* 2021; 2(4):170–182.
 28. Zalewska-Piątek B. Phage Therapy-Challenges, Opportunities and Future Prospects. *Pharmaceuticals (Basel)* 2023; 16(12):1638. doi:10.3390/ph16121638.

LYTIC PROPERTIES OF *ENTEROBACTER* spp. BACTERIOPHAGES AGAINST BACTERIAL INFECTION AGENTS CIRCULATING IN RUSSIA AND VIETNAM

L.V. KATAEVA, A.A. VAKARINA, N.F. KARPUKHINA,
O.V. POSOYUZNYKH, K.B. STEPANOVA

Tyumen Region Infection Pathology Research Institute of Rospotrebnadzor, Tyumen

The threat of global spread of strains with multiple resistance to antimicrobial drugs is particularly acute today. Bacteriophages and drugs based on them are an alternative solution to the problem. The selection of industrial bacteriophages with a broad spectrum of action is one of the important stages in the creation of drugs. The aim of the study was to investigate the lytic properties of experimental series of *Enterobacter* spp. bacteriophages against pathogens of bacterial infections circulating in the territories of Russia and Vietnam. The study of the lytic properties of *Enterobacter* spp. bacteriophages was carried out using the spot-test method. Higher activity of bacteriophages against bacteria isolated from territories corresponding to the place of bacteriophage isolation was established. Strains of bacteriophages promising for further use in the Russian Federation as diagnostic, prophylactic and therapeutic drugs were identified. The effectiveness of the presented phage cocktail was 58%.

Keywords: bacteriophages; *Enterobacter* spp.; antibiotic resistance, lytic properties of bacteriophages, Socialist Republic of Vietnam.

Address:

Kataeva L.V., Doctor of Medical Sciences,
head of the bacteriological Laboratory of Tyumen Region
Infection Pathology Research Institute of Rospotrebnadzor
E-mail: kataevalv@tniikip.rospotrebnadzor.ru

Для цитирования:

Катаева Л.В., Вакарина А.А., Карпукхина Н.Ф., Посоюзных О.В., Степанова К.Б. Литические свойства бактериофагов *Enterobacter* spp. В отношении возбудителей бактериальных инфекций, циркулирующих на территориях России и вьетнам. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2026; 22(1): 35–42.

For citation:

Kataeva L.V., Vakarina A.A., Karpukhina N.F., Posoyuznykh O.V., Stepanova K.B. Lytic properties of *Enterobacter* spp. bacteriophages against bacterial infection agents circulating in Russia and Vietnam. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2026; 22(1):35–42 (in Russian).

ЭМУЛЬГИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ПОЛИСАХАРИДОВ НЕКОТОРЫХ ГРИБОВ И БАКТЕРИЙ

О.О. БАБИЧЕВА^{1*}, И.М. АБРАМЕНКО¹, Г.Е. РЫСМУХАМБЕТОВА¹, Н.В. КИЧЕМАЗОВА¹,
Г.Т. УРЯДОВА², Л.В. КАРПУНИНА¹

¹Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии
имени Н.И. Вавилова, г. Саратов;

²Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского, г. Саратов

В последние годы большинство отраслей промышленности придерживаются наиболее устойчивого и экологически чистого подхода, используя различные биологически активные вещества, которые являются более безопасными по сравнению с синтетическими. Приоритет к использованию экологически чистых биоактивных соединений, в первую очередь, отводится пищевой промышленности. В настоящей работе проведено исследование стабилизирующих свойств некоторых грибных и бактериальных полисахаридов в сравнении с коммерческими эмульгаторами. Показано, что изученные биополимеры обладают эмульгирующей активностью и имеют сопоставимый с коммерческими эмульгаторами высокий эмульсионный потенциал. Наибольшей эмульгирующей активностью в присутствии подсолнечного масла обладают экзополисахариды (ЭПС) *Streptococcus thermophilus* и полисахариды (ПС) *Agaricus bisporus* 533, *Pleurotus ostreatus* P-88; в отношении гексана – ЭПС *Xanthobacter xylophilus* Z-0055, *Lactococcus lactis* B-1662, *S. thermophilus*, *Xanthomonas campestris* B-610/1 и ПС *A. bisporus* 508; в отношении керосина – ПС *P. ostreatus* P-88, *P. ostreatus* НК-35, *A. bisporus* 508, *A. bisporus* 533 и ЭПС *X. xylophilus* Z-0055, *L. lactis* B-1662. Применение эмульгаторов, изготовленных на основе ПС грибного и бактериального происхождения с присутствием им биоактивностью, может стать достойной альтернативой синтетическим эмульгаторам.

Ключевые слова: грибы; базидиомицеты; бактерии; полисахариды; экзополисахариды; ксантан; лецитин; эмульгирующая активность; эмульгаторы.

Введение

Широкое применение эмульсионных систем в различных областях промышленности, в том числе пищевой, химической, технической, нефтеперерабатывающей, в сельском хозяйстве, и наблюдаемая мировая тенденция отказа от синтетических эмульгаторов привели к росту потребности в высокоэффективных природных биологически активных веществах (БАВ) [3, 7, 8, 12, 22]. Замена синтетических поверхностно-активных веществ (ПАВ) на биосовместимые соединения является ключевым моментом в расширении сфер применения эмульсий при создании функциональных продуктов питания. Имеются сведения, что применение синтетических ПАВ для стабилизации эмульсий всё

чаще оказывает негативное влияние на организм потребителей, а возможное связывание анионных ПАВ с белками способно привести к изменению их структуры, что зачастую приводит к потере их биологических функций, в частности, ферментативной активности и, как следствие, серьезным нарушениям метаболизма [11, 31, 37].

В последнее время в качестве биополимеров для стабилизации эмульсий, наряду с белками, фосфолипидами, сапонинами [2, 4, 6, 23], используют полисахариды (ПС), такие как пектин, различные камеди, галактоманнаны, крахмал, целлюлоза, нанокристаллы хитина и др. [30, 36]. Выбор ПС обусловлен тем, что, по сравнению с белком – стабилизатором большинства эмульсий природного происхождения, ПС формируют более объемный гидратный слой, который способствует повышению стабильности эмульсий за счет структурного фактора [35], а низкая усвояемость ПС в желудочно-кишечном тракте способствует замедлению скорости высвобождения БАВ [27].

Среди растительных ПС в настоящее время особое место отводится модифицированным крахмалам как

© 2026 г. Бабичева О.О., Абраменко И.М., Рысмухамбетова Г.Е., Кичемазова Н.В., Урядова Г.Т., Карпунина Л.В.

* Автор для переписки:

Бабичева Олеся Олеговна

аспирант кафедры «Микробиология и биотехнология» ФГБОУ ВО Вавиловский университет

E-mail: olesya.sultanova.98@mail.ru

высокоэффективным компонентам для стабилизации эмульсий [18, 32].

Одним из наиболее известных и хорошо изученных биоэмульгаторов является эмульсан, продуцируемый штаммом бактерий *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, который представляет собой комплекс анионного гетерополисахарида и белка [39, 43]. Другой биоэмульгатор, аласан, состоящий из аланина, ПС и белков, производится штаммом бактерий *Acinetobacter radioresistens* КА53 [40–42]. Имеются сведения об эмульгирующих свойствах таких ПС как полимиксан, продуцентами которого являются бактерии *Paenibacillus polymyxa* 88А [16] и декстран, производимый бактериями видов *Leuconostoc mesenteroides* и *Streptococcus mutans* [34]. Известно, что консорциум пробиотических микроорганизмов на основе *S. thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, продуцирующий ПС, способен эмульгировать масло семян льна [17], что потенциально может применяться в пищевой промышленности.

Грибные ПС, в частности хитин-глюкановый комплекс, входящий в состав базидиомицетов, используются в промышленности в качестве эмульгатора, загустителя и стабилизатора для пищевых продуктов [9, 10]. Хитозан, получаемый из мицелия гриба *Aspergillus niger* [14], является эффективным эмульгатором для стабилизации гетерогенных систем, позволяющим увеличивать вязкость дисперсионной фазы, затруднять диффузию дисперсных частиц и снижать скорость агрегации капель [21, 28, 33, 38]. В пищевой промышленности этот ПС используют в качестве эмульгатора, загустителя и структурообразователя для продуктов диетического питания, способствующих выведению радионуклидов из организма [26]. Из грибов вида *Aureobasidium pullulans* получают ПС аубазидан, применяемый как стабилизатор суспензий и эмульсий при приготовлении лекарственных форм в фармакологии, пищевой промышленности и при нефтедобыче [1]. Также к нефтедеструкторам — продуцентам ПС (гексозанов) относят штаммы *Aspergillus* spp., обладающие значительной эмульгирующей активностью в отношении нефти, керосина и моторного масла [13].

Таким образом, имеющиеся сведения о применении природных биополимеров, в частности, грибных и бактериальных ПС в качестве эмульгаторов, свидетельствуют об актуальности этой проблемы и необходимости изыскания новых потенциальных продуцентов для их получения, что является приоритетной задачей в современном мире.

В связи с этим целью данной работы явилось исследование эмульгирующих свойств некоторых (новых) ПС грибной и бактериальной природы.

Материалы и методы

Объектами исследования явились: ПС, полученные из различных штаммов базидиомицетов: *Pleurotus ostreatus* P-88, *Pleurotus ostreatus* НК-35, *Agaricus bisporus* 508, *Agaricus bisporus* 533 [15]; бактериальные экзополисахариды (ЭПС) штаммов молочнокислых бактерий *Streptococcus thermophilus* [24], *Lactococcus lactis* В-1662 [25], а также ксантомонан, полученный из *Xanthomonas campestris* В-610/1 [19], клебсилан, полученный из *Klebsiella pneumoniae* К2 [20], ксилофиан, полученный из *Xanthobacter xylophilus* Z-0055 [5]. Кроме того, в работе были использованы коммерческие эмульгаторы: ксантановая камедь (Novenzyme Products Limited, China) и лецитин соевый (Orison Chemicals Limited, China).

В качестве субстратов для определения эмульгирующей активности использовали подсолнечное масло (ООО «Товарное хозяйство»), гексан (ЗАО «Купавнареактив») и керосин (ООО «ЛД-Трейд»).

Определение индекса эмульгирования растворов ПС проводили по методу Д.Г. Купера и Б.Г. Голденберга [29]. Для этого получали 2% водный раствор ПС, после чего сверху наслаивали гидрофобный субстрат (подсолнечное масло, гексан, или керосин). Полученную смесь интенсивно встряхивали на вортексе в течение 5 минут. Через 1, 2, 3, 7, 14 и 21 сутки измеряли высоту стабильного слоя эмульсии. Индекс эмульгирования (Е) рассчитывали, как отношение высоты слоя эмульсии к общей высоте жидкости:

$$E = \frac{\text{высота слоя эмульсии}}{\text{общая высота жидкости}} \times 100\%$$

Каждый эксперимент повторяли не менее трёх раз. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью Microsoft Excel 2019 и Origin 7.

Результаты и обсуждение

При изучении эмульгирующих свойств ПС базидиомицетов было показано, что и ПС вешенки, и ПС шампиньонов в разной степени проявляли эмульгирующую активность (ЭА) по отношению к подсолнечному маслу, гексану и керосину. Наибольшая активность в отношении подсолнечного масла была у ПС грибов *P. ostreatus* P-88, *A. bisporus* 533 и *P. ostreatus* НК-35. У ПС штамма *P. ostreatus* P-88, как видно из таблицы 1, ЭА через 21 сутки значительно отличалась от первоначальной, в то время как у ПС *A. bisporus* 533 и *P. ostreatus* НК-35 ЭА

по сравнению с первыми сутками уменьшалась почти в 23 и 5 раза, соответственно. В ходе эксперимента было замечено, что ПС *A. bisporus* 508 образовывали менее устойчивые эмульсии в отношении подсолнеч-

ного масла. В присутствии гексана ЭА была отмечена только у ПС *P. ostreatus* НК-35 и *A. bisporus* 508, однако к 21 суткам снижалась в 4 и 6 раза, соответственно (таблица 2).

Таблица 1

Определение индекса эмульгирования в присутствии подсолнечного масла (%)

Образец	Гидрофобный субстрат					
	Подсолнечное масло					
	Сутки					
	1	2	3	7	14	21
ПС <i>P. ostreatus</i> P-88	40±0,2	32±0,4	32±0,4	30±0,5	30±0,2	30±0,2
ПС <i>P. ostreatus</i> НК-35	31±0,3	22±0,7	20±0,2	11±0,9	8±0,6	6±0,5
ПС <i>A. bisporus</i> 508	4±0,3	2±0,2	2±0,2	2±0,2	2±0,2	2±0,2
ПС <i>A. bisporus</i> 533	46,8±0,6	38±0,2	38±0,3	4±0,5	2±0,2	2±0,1
ЭПС <i>S. termophilus</i>	50±0,5	50±0,5	47,9±0,4	25±1,1	25±1,0	25±0,7
ЭПС <i>L. lactis</i> B-1662	30±0,4	28,3±0,8	26,4±0,7	22,6±0,5	22±0,4	5,6±0,7
ЭПС <i>X. campestris</i> B-610/1 (ксантомонан)	22,7±0,2	22,5±0,3	22,3±0,2	22±0,6	20,4±0,4	20±0,5
ЭПС <i>X. xylophilus</i> Z-0055 (ксилофилян)	44±0,1	44±0,1	44±0,1	44±0,1	44±0,1	44±0,2
ЭПС <i>K. pneumoniae</i> K2 (клебсилан)	отсутствует					
Ксантановая камедь	отсутствует					
Лецитин соевый	55,3±0,7	48,2±0,9	44,6±0,2	отсутствует		

Таблица 2

Определение индекса эмульгирования в присутствии гексана (%)

Образец	Гидрофобный субстрат					
	Гексан					
	Сутки					
	1	2	3	7	14	21
ПС <i>P. ostreatus</i> P-88	отсутствует					
ПС <i>P. ostreatus</i> НК-35	37±0,5	34±0,4	24±0,7	17±0,6	9±0,2	9±0,2
ПС <i>A. bisporus</i> 508	57±0,7	49±0,4	43±0,2	22±0,5	14±0,9	10±0,6
ПС <i>A. bisporus</i> 533	отсутствует					
ЭПС <i>S. termophilus</i>	61,3±0,5	45,4±0,3	34±0,8	отсутствует		
ЭПС <i>L. lactis</i> B-1662	64,7±0,8	52,9±0,4	41,1±0,2	8,8±0,5	отсутствует	
ЭПС <i>X. campestris</i> B-610/1 (ксантомонан)	53,5±0,7	46,5±0,2	46±0,5	44,1±0,3	44±0,2	39,5±0,6
ЭПС <i>X. xylophilus</i> Z-0055 (ксилофилян)	65,2±0,2	60,8±0,3	58,6±0,2	21,7±0,4	отсутствует	
ЭПС <i>K. pneumoniae</i> K2 (клебсилан)	отсутствует					
Ксантановая камедь	отсутствует					
Лецитин соевый	26,6±0,3	22,2±0,7	11,1±0,4	11±0,6	8,8±0,4	6,6±0,3

В отношении керосина ПС грибов проявляли наибольшую степень активности. Так, у ПС *P. ostreatus* P-88, *A. bisporus* 533 и *A. bisporus* 508 ЭА составила на первые сутки 72,7, 64 и 60%, соответственно, а к 21 суткам снижение стабильности эмульсии происходило

всего в 1,5, 1,4 и 1,4 раза, соответственно (таблица 3). Менее высокий процент эмульсии, по сравнению другими ПС грибов в отношении керосина был замечен у ПС *P. ostreatus* НК-35, который составил на 1 сутки 52%, а к 21 суткам был ниже в 3 раза.

Таблица 3

Определение индекса эмульгирования в присутствии керосина (%)

Образец	Гидрофобный субстрат					
	Керосин					
	Сутки					
	1	2	3	7	14	21
ПС <i>P. ostreatus</i> P-88	72,7±0,5	63±0,3	62,8±0,2	56,3±0,4	50,9±0,3	48,1±0,8
ПС <i>P. ostreatus</i> НК-35	52±0,6	44±0,8	38±0,5	16±0,3	16±0,3	16±0,3
ПС <i>A. bisporus</i> 508	64±0,4	50±0,7	49±0,3	49±0,3	47±0,2	46±0,5
ПС <i>A. bisporus</i> 533	60±0,3	46±0,4	46±0,4	46±0,3	46±0,4	44±0,6
ЭПС <i>S. termophilus</i>	47,7±0,6	45,4±0,7	45±0,7	25±0,3	20,4±0,9	20±0,7
ЭПС <i>L. lactis</i> B-1662	58,6±1,1	58±0,7	56,5±0,6	50±0,3	41,3±0,4	39,1±0,2
ЭПС <i>X. campestris</i> B-610/1 (ксантомонан)	31,7±0,9	24,3±0,3	24,1±0,7	24±0,3	24±0,2	21,9±0,4
ЭПС <i>X. xylophilus</i> Z-0055 (ксилофилян)	67,4±0,2	62,7±0,5	62±0,3	55,8±0,3	46,5±0,4	41,8±0,6
ЭПС <i>K. pneumoniae</i> K2 (клебсилан)	34,6±0,7	34,2±0,2	34±0,3	30,6±0,9	10,2±0,8	10±0,5
Ксантановая камедь	45±0,5	40±0,3	40±0,4	37,5±0,2	25±0,4	25±0,4
Лецитин соевый	37±0,6	33,3±0,9	33±0,7	33±0,4	27,7±0,3	27±0,2

Эмульгирующие свойства бактериальных ЭПС также проявлялись в разной степени в зависимости от используемого субстрата. В присутствии подсолнечного масла наибольшая активность была отмечена у ЭПС *S. termophilus* и *X. xylophilus* Z-0055, однако к 21 суткам у первого образца ЭПС эмульсия снижалась в 2 раза, а у второго — не изменялась на протяжении всего исследования (таблица 1). На первые сутки ЭПС *L. lactis* B-1662 образовывал эмульсию в пределах 30%, но к 21 суткам активность снижалась в 5 раз. Не высокой, но достаточно устойчивой ЭА на протяжении 21 суток в присутствии подсолнечного масла обладал ЭПС *X. campestris* B-610/1. Полное отсутствие ЭА в отношении подсолнечного масла было отмечено у ЭПС *K. pneumoniae* K2.

В присутствии гексана высокий процент эмульсии на первые сутки был отмечен у ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 (65,2%), *L. lactis* B-1662 (64,7%), *S. termophilus* (61,3%) и *X. campestris* B-610/1 (53,5%), однако к 7–14 суткам у первых трёх образцов было отмечено полное отсутствие ЭА, а у четвёртого была отмечена устойчивость эмульсии, которая к 21 суткам снижалась всего в 1,4 раза (таблица 2). Отсутствие ЭА в отношении гексана было отмечено у ЭПС *K. pneumoniae* K2.

В отношении керосина у всех бактериальных ЭПС была отмечена ЭА (таблица 3). Наиболее высокие показатели на первые сутки были отмечены у *X. xylophilus* Z-0055 (67,4%) и *L. lactis* B-1662 (58,6%), через 21 сутки снижение стабильности эмульсии происходило в 1,6 и 1,5 раза, соответственно. Менее высоким процентом

эмульсии обладали ЭПС *S. termophilus*, *X. campestris* B-610/1 и *K. pneumoniae* K2, по сравнению с другими бактериальными ЭПС, однако к 21 суткам ЭА исследуемых образцов снижалась всего в 2,3, 3,4 и 1,4 раза.

При изучении коммерческих эмульгаторов было показано, что в отношении подсолнечного масла ЭА обладал только лецитин соевый: на первые сутки стабильность эмульсии составляла 55,3%, но к 7 суткам уже полностью отсутствовала (таблица 1). В присутствии гексана ЭА обладал только лецитин соевый, на первые сутки эмульсия составляла 26,6%, а к 21 суткам снижалась в 4 раза (таблица 2). В отношении керосина все исследованные коммерческие эмульгаторы проявляли эмульгирующую способность (таблица 3). На первые сутки у ксантановой камеди активность составляла 45%, у лецитина соевого 37%, а к 21 суткам ЭА снижалась в 1,8 и 1,3 раза, соответственно.

Так, в присутствии гидрофобного субстрата — подсолнечного масла наибольшая ЭА отмечена у лецитина соевого (55,3%), ЭПС *S. termophilus* (50%) и ПС *A. bisporus* 533 (46,8%). Устойчивость эмульсии в отношении подсолнечного масла (на протяжении 21 суток) была отмечена у ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 (44%), *X. campestris* B-610/1 (22,7–20%) и ПС *P. ostreatus* P-88 (40–30%).

В отношении гексана наибольшая ЭА отмечена у ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 (65,2%), *L. lactis* B-1662 (64,7%), *S. termophilus* (61,3%) и ПС *A. bisporus* 508 (57%). Наиболее устойчивые эмульсии в отношении гексана образовывали ЭПС *X. campestris* B-610/1 (53,5–39,5%).

В отношении керосина у всех образцов была отмечена ЭА и устойчивость эмульсии. Наибольшую ЭА в отношении керосина проявляли ПС *P. ostreatus* P-88 (72,7%), *A. bisporus* 508 (64%), *A. bisporus* 533 (60%), *P. ostreatus* НК-35 (52%) и ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 (67,4%), *L. lactis* B-1662 (58,6%). Повышенной устойчивостью обладали ПС *P. ostreatus* P-88 (72,7–48,1%), *A. bisporus* 508 (64–46%), *A. bisporus* 533 (60–44%) и ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 (67,4–41,8%), и *L. lactis* B-1662 (58,6–39,1%).

Заключение

Таким образом, как показывают результаты настоящего исследования, ПС некоторых грибов и бактерий обладают эмульгирующей активностью. Способность ПС грибов и ЭПС бактерий формировать стабильные эмульсии может служить основанием их успешного в перспективе применения в пищевой промышленности и других отраслях народного хозяйства.

Авторы выражают благодарность к.б.н. Федоненко Юлии Петровне, заведующему лабораторией «Биохимия» ФИЦ СЦЦ РАН Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук», за консультацию при определении эмульгирующей активности.

Литература

1. А. с. № 1659484 А1 СССР, МПК С12Р 19/04, С12N 1/14, С12R 1/645. Питательная среда для культивирования гриба *Aureobasidium pullulans* штамм 8 — продуцента аубазидана. № 4641651. заявл. 25.01.1989. опубл. 30.06.1991. Е.Ф. Григорьев, Н.П. Елинов, В.А. Болоховская, М.Ф. Петренко, С.Б. Кравченко, Л.Н. Шинкаренко, А.П. Коваленко. — 4 с.
2. Абрамзон А.А., Абрамова И.В. Некоторые особенности стабилизации эмульсий высокомолекулярными ПАВ // Коллоидный журнал. — 1972. — Т. 34. — № 3. — С. 444–446.
3. Алексеев А.Л., Сазонов К.К. Роль эмульгаторов в пищевой промышленности // Инициативы молодых — науке и производству: сб. ст. VII Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов. — Пенза: Пензенский гос. аграрный ун-т, 2024. — С. 519–521.
4. Измайлова В.Н., Ребиндер П.А. Структурообразование в белковых системах. — Москва: Наука, 1974. — 267 с.
5. Кичемазова Н.В., Бухарова Е.Н., Селиванов Н.Ю., Бухарова И.А., Карпунина Л.В. Получение, свойства и сферы возможного применения экзополисахаридов бактерий родов *Xanthobacter* и *Ancylobacter* // Прикладная биохимия и микробиология. — 2017. — Т. 53. — № 3. — С. 285–290.
6. Ланге К.Р. Поверхностно-активные вещества. Синтез, свойства, анализ, применение. — Санкт-Петербург: Профессия, 2005. — 238 с.
7. Лозикова Ю.Г. Влияние анионных и катионных эмульгаторов на структурообразование битумных эмульсий // Актуальные проблемы инженерных наук: материалы VI-й ежегодной науч.-практ. конф. преподавателей, студентов и молодых ученых Северо-Кавказского федерального ун-та «Университетская наука — региону». — Ставрополь: ООО ИД «ТЭСЭРА», 2018. — С. 272–275.
8. Малыгин А.В., Шевченко М.П., Букреев Н.И., Рачинский А.В. Комплексный анализ технических эмульгаторов физико-химическими методами // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2009. — Т. 9. — № 6. — С. 810–818.
9. Минакова М.В., Лаут И.В., Минаков Д.В. Хитин-глюкановые комплексы высших грибов как основа для создания материалов, используемых в пищевой промышленности // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: Материалы XIV Всерос. научн.-практ. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых с междунар. участием, посвящ. 90-летию юбилею акад. Саковича Г.В. — Бийск: Алтайский гос. техн. ун-т им. И.И. Ползунова, 2021. — С. 278–279.
10. Минаков Д.В., Егорова Е.Ю., Маркин В.И., Базарнова Н.Г. Современные подходы к выделению и модификации макромолекул хитина и хитозана высших грибов для их прикладного использования // Химия растительного сырья. — 2023. — № 4. — С. 29–52.
11. Нуштаева А.В., Вилкова Н.Г. Гидрофобизация частиц кремнезема различными катионными по верхностно-активными веществами // Известия высших учебных заведений. Серия химия и химическая технология. — 2021. — Т. 64. — № 3. — С. 41–45.
12. Околелова Т.М., Мансуров Р.Ш., Сафонов А.П. Эмульгатор для птицеводства // Комбикорма. — 2015. — № 10. — С. 71–72.
13. Пархоменко А.Н. Скрининг микроорганизмов-деструкторов нефтяных углеводородов // Экобиотех. — 2019. — Т. 2. — № 3. — С. 330–338.
14. Патент № 2678125. Способ получения хитозана. № 2017144399. заявл. 18.12.2017. опубл. 23.01.2019. Л.В. Новинюк, В.Л. Кабанов, Д.Х. Кулев, П.З. Велизон. — 8 с.
15. Патент № 2838744. Способ получения полисахаридов из базидиомицетов. № 2024106268. заявл. 12.03.2024. опубл. 22.04.2025. Л.В. Карпунина, Е.А. Логачева, О.О. Бабичева. — 7 с.
16. Птичкина Н.М., Бухарова Е.Н., Маркина О.А., Гусева Л.В., Карпунина Л.В. Полисахариды пектин и полимиксан 88А как стабилизаторы тыквенного сока с мякотью // Биотехнология: состояние и перспективы развития: мате-

- риалы II междунар. конгр. (Москва, 10–14 ноября 2003 г.). – Москва: «ПИК Максима», 2003. – С. 125–126.
17. Родионова Н.С., Попов Е.С., Захаров В.С., Власенко Б.Н. Исследование применения биомасс консорциумов пробиотических микроорганизмов в технологии эмульсий биоактивных растительных масел // Пищевая промышленность. – 2023. – № 5. – С. 20–22.
 18. Руськина А.А., Потороко И.Ю. Технология синтеза резистентного крахмала, применимого для эмульсионных систем, на основе ультразвуковой кавитации // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. – 2023. – Т. 11. – № 2. – С. 41–48.
 19. Рысмухамбетова Г.Е., Бухарова Е.Н., Карпунина Л.В. Выделение полисахаридов из штаммов *Xanthomonas campestris* // Вавиловские чтения – 2005: Материалы Всерос. научн.-практ. конф., посвящ. 118-й годовщине со дня рождения акад. Николая Ивановича Вавилова. – Саратов, 2005. – С. 88–90.
 20. Рысмухамбетова Г.Е., Штыркова И.А., Бухарова Е.Н., Карпунина Л.В. Получение полисахаридов из *Klebsiella pneumoniae* // Вавиловские чтения – 2006: Материалы конф., посвящ. 119-й годовщине со дня рождения Николая Ивановича Вавилова. – Саратов, 2006. – С. 85–86.
 21. Сорокин А.В., Холявка М.Г., Лавлинская М.С. Синтез и свойства водных растворов графт-сополимеров хитозана и N-винилимидазола // Конденсированные среды и межфазные границы. – 2021. – Т. 23. – № 4. – С. 570–577.
 22. Сурикова Н.А. Применение эмульгаторов в химической промышленности // Новое слово в науке. Молодежные чтения. – Ставрополь: Общество с ограниченной ответственностью «Секвойя», 2017. – С. 201–202.
 23. Трапезников А.А., Зотова К.В., Шамрова Н.В. Механические свойства поверхностных слоев и поверхностного натяжения растворов сапонинов // Коллоидный журнал. – 1970. – Т. 32. – № 3. – С. 437–443.
 24. Урядова Г.Т., Тяпкин А.Ю., Фокина Н.А., Карпунина Л.В. Выделение экзополисахарида *Streptococcus thermophilus* // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий: Материалы Всерос. научн.-практ. конф. – Саратов: ИЦ «Наука», 2015. – С. 109–113.
 25. Фокина Н.А., Урядова Л.В., Карпунина Л.В. Выделение экзополисахарида из *Lactococcus lactis* при различных условиях культивирования // Аграрный научный журнал. – 2016. – № 12. – С. 40–42.
 26. Шепило Е.А., Садовой В.В., Трубина И.А., Шпак Ю.В., Цедрина Т.В. Исследование молекулярной структуры хитозана и изучение возможности его использования при производстве мясopодуков // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: Материалы Девятой междунар. конф. – Москва: Изд-во ВНИРО, 2008. – С. 238–240.
 27. Anal A.K., Shrestha S., Sadiq M.B. Biopolymeric-based emulsions and their effects during processing, digestibility and bioaccessibility of bioactive compounds in food systems // Food Hydrocolloids. – 2019. – Vol. 87. – P. 691–702.
 28. Chang H.W., Tan T.B., Tan P.Y., Nehdi I.A., Sbihi H.M., Tan C.P. Microencapsulation of fish oil-in-water emulsion using thiol-modified β -lactoglobulin fibrils-chitosan complex // J. Food Eng. – 2020. – Vol. 264. – Art. 109680. doi:10.1016/j.jfoodeng.2019.07.027.
 29. Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species // Appl. and Environ. Microbiol. – 1987. – Vol. 53. – No. 2. – P. 224–229.
 30. Feng S., Guo Y., Liu F., Li Z., Chen K., Handa K., Zhang Y. The impacts of complexation and glycated conjugation on the performance of soy protein isolate-gum Arabic composites at the o/w interface for emulsion-based delivery systems // Food Hydrocolloids. – 2023. – Vol. 135. – Art. 108168. doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.108168.
 31. Han W., Long W., Peng L., Zhang W., Shi B. Effect of nonionic and anionic surfactant on ecotoxicity and micellization behaviors of dodecyl trimethyl ammonium bromide (DTAB) // Colloids Surf. A. Physicochem. Eng. Asp. – 2023. – Vol. 671. – Art. 131588. doi: 10.1016/j.colsurfa.2023.131588.
 32. Haralampu S.G. Resistant starch – a review of the physical properties and biological impact of RS3 // Carbohydrate Polymers. – 2000. – Vol. 41. – No. 3. – P. 285–292.
 33. Ji C., Luo Y. Plant protein-based high internal phase Pickering emulsions: Functional properties and potential food applications // J. Agr. and Food Res. – 2023. – Vol. 12. – Art. 100604. doi: 10.1016/j.jafr.2023.100604.
 34. Kothari D., Das D., Patel S., Goyal A. Dextran and food application // In: Ramawat K., Mérillon J.M. (eds). Polysaccharides. – Springer, Cham, 2014. – P. 1–16. doi: 10.1007/978-3-319-03751-6_66-1.
 35. Lin J. Genipin crosslinked sugar beet pectin-whey protein isolate/bovine serum albumin conjugates with enhanced emulsifying properties // Food Hydrocolloids. – 2020. – Vol. 105. – Art. 105802. doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.105802.
 36. Niu H., Hou K., Chen H., Fu X. A review of sugar beet pectin-stabilized emulsion: Extraction, structure, interfacial self-assembly and emulsion stability // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. – 2024. – Vol. 64. – No. 3. – P. 852–872.
 37. Paciello S., Russo T., De Marchi L., Soares A.M.V.M., Meucci V., Pretti C., He Y., Della Torre C., Freitas R. Sublethal effects induced in *Mytilus galloprovincialis* after short-term exposure to sodium lauryl sulfate: Comparison of the biological responses given by mussels under two temperature scenarios // Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol. – 2023. – Vol. 270. – Art. 109644. doi: 10.1016/j.cbpc.2023.109644.
 38. Rodriguez M.S., Albertengo L.A., Agulló E. Emulsification capacity of chitosan // Carbohydrate polymers. – 2002. – Vol. 48. – No. 3. – P. 271–276. doi: 10.1016/S0144-8617(01)00258-2.
 39. Rosenberg E., Zuckerberg A., Rubinovitz C., Gutnick D.L. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Isolation and emulsifying

- properties // *App. and Environ. Microbiol.* — 1979. — Vol. 37. — No. 3. — P. 402–408.
40. Toren A., Navon-Venezia S., Ron E.Z., Rosenberget E. Emulsifying activities of purified alasan proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53 // *Appl. and Environ. Microbiol.* — 2001. — Vol. 67. — No. 3. — P. 1102–1106.
 41. Toren A., Orr E., Paitan Y., Ron E.Z., Rosenberg E. The active component of the bioemulsifier alasan from *Acinetobacter radioresistens* KA53 is an OmpA-like protein // *J. Bacteriol.* — 2002. — Vol. 184. — No. 1. — P. 165–170.
 42. Toren A., Segal G., Ron E.Z., Rosenberg E. Structure — function studies of the recombinant protein bioemulsifier AlnA // *Environ. Microbiol.* — 2002. — Vol. 4. — No. 5. — P. 257–261.
 43. Zosim Z., Fleminger G., Gutnick D., Rosenberg E., Wise G.S. Effect of protein on the emulsifying activity of emulsan // *J. Dispers. Sci. Technol.* — 1989. — Vol. 10. — No. 3. — P. 307–317.
- References**
1. Аs № 1659484 А1 SSSR, МРК С12Р 19/04, С12N 1/14, С12R 1/645. Питател'ная среда для культивирования гриба *Aureobasidium pullulans* штамм 8 — продуцента аубазидана. № 4641651. заявл 25.01.1989. опублик. 30.06.1991. ЯФ Григор'ев, НР Яелинов, ВА Болоховская, МР Петренко, СР Кравченко, ЛН Шинкаренко, АР Коваленко. 4 р (in Russian).
 2. Abramzon AA, Abramova IV. Nekotoryye osobennosti stabilizatsii emul'siy vysokomolekulyarnymi PAV. *Kolloidnyy zhurnal* 1972; 34(3):444–446 (in Russian).
 3. Alekseyev AL, Sazonov KK. Rol' emul'gatorov v pishchevoy promyshlennosti. *Iniatsiivnyy molodykh — nauke i proizvodstvu: sb st VII Vseros nauch-prakt konf molodykh uchenykh i studentov. Penza: Penzenskiy gos. agrarnyy un-t, 2024: 519–521 (in Russian).*
 4. Izmaylova VN, Rebinder PA. *Strukturoobrazovaniye v belkovykh sistemakh.* Moscow: Nauka, 1974: 267 (in Russian).
 5. Kichemazova NV, Bukharova YeN, Selivanov NYu, Bukharova IA, Karpunina LV. Polucheniye, svoystva i sfery vozmozhnogo primeneniya ekzopolisakharidov bakteriy rodov *Xanthobacter* i *Ancylobater*. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* 2017; 53(3):285–290 (in Russian).
 6. Lange KR. *Poverkhnostno-aktivnyye veshchestva. Sintez, svoystva, analiz, primeneniye.* St. Petersburg: Professiya, 2005: 238 (in Russian).
 7. Lozikova YuG. Vliyaniye anionnykh i kationnykh emul'gatorov na strukturoobrazovaniye bitumnykh emul'siy. Aktual'nyye problemy inzhenernykh nauk: materialy VI-y yezhegodnoy nauch.-prakt. konf. prepodavateley, studentov i molodykh uchenykh Severo-Kavkazskogo federal'nogo un-ta «Universitetskaya nauka — regionu». Stavropol': OOO ID «TESERA», 2018: 272–275 (in Russian).
 8. Malygin AV, Shevchenko MP, Bukreyev NI, Rachinskiy AV. Kompleksnyy analiz tekhnicheskikh emul'gatorov fiziko-khimicheskimi metodami. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy* 2009; 9(6):810–818 (in Russian).
 9. Minakova MV, Laut IV, Minakov DV. Khitin-glyukanovyye komplekсы vysshikh gribov kak osnova dlya sozdaniya materialov, ispol'zuyemykh v pishchevoy promyshlennosti. *Tekhnologii i oborudovaniye khimicheskoy, biotekhnologicheskoy i pishchevoy promyshlennosti: Materialy XIV Vseros nauchn-prakt konf studentov, aspirantov i molodykh uchenykh s mezhdunar uchastiyem, posvyashch 90-letnemu yubileyu akad Sakovicha GV. Biysk: Altayskiy gos tekhn un-t im II Polzunova, 2021: 278–279 (in Russian).*
 10. Minakov DV, Yegorova YeYu, Markin VI, Bazarnova NG. Sovremennyye podkhody k vydeleniyu i modifikatsii makromolekul khitina i khitozana vysshikh gribov dlya ikh prikladnogo ispol'zovaniya. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* 2023; 4:29–52 (in Russian).
 11. Nushtayeva AV, Vilkova NG. Gidrofobizatsiya chastits kremnezema razlichnymi kationnymi po verkhnostno-aktivnymi veshchestvami. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Seriya khimiya i khimicheskaya tekhnologiya* 2021; 64(3):41–45 (in Russian).
 12. Okolelova TM, Mansurov RSh, Safonov AP. Emul'gator dlya pittevodstva. *Kombikorma* 2015; 10:71–72 (in Russian).
 13. Parkhomenko AN. Skringing mikroorganizmov-destruktorov neftnykh uglevodorodov. *Ekobiotekh* 2019; 2(3):330–338 (in Russian).
 14. Patent № 2678125. Sposob polucheniya khitozana. № 2017144399. заявл 18.12.2017. опублик. 23.01.2019. LV Novinyuk, VL Kabanov, DKH Kulev, PZ Velinon. 8 р (in Russian).
 15. Patent № 2838744. Sposob polucheniya polisakharidov iz bazidiomitsetov. № 2024106268. заявл 12.03.2024. опублик. 22.04.2025. LV Karpunina, YeA Logacheva, OO Babicheva. 7 р (in Russian).
 16. Ptichkina NM, Bukharova YeN, Markina OA, Guseva LV, Karpunina LV. Polisakharidy pektin i polimiksan 88A kak stabilizatory tykvennogo soka s myakot'yu. *Biotekhnologiya: sostoyaniye i perspektivy razvitiya: materialy II mezhdunar. kongr. (Moskva, 10–14 noyabrya 2003 g).* Moscow: «PIK Maksima», 2003:125–126 (in Russian).
 17. Rodionova NS, Popov YeS, Zakharov VS, Vlasenko BN. Issledovaniye primeneniya biomass konsortsiumov probioticheskikh mikroorganizmov v tekhnologii emul'siy bioaktivnykh rastitel'nykh masel. *Pishchevaya promyshlennost'* 2023; 5:20–22 (in Russian).
 18. Rus'kina AA, Potoroko IYu. Tekhnologiya sinteza rezistentnogo krakhmala, primenimogo dlya emul'sionnykh sistem, na osnove ul'trazvukovoy kavitatsii. *Vestnik Yuzhno-Ural'skogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Pishchevye i biotekhnologii* 2023; 11(2):41–48 (in Russian).
 19. Rysmukhambetova GYe, Bukharova YeN, Karpunina LV. Vydeleniye polisakharidov iz shtammov *Xanthomonas campestris*. *Vavilovskiye chteniya — 2005: Materialy Vseros nauchn-prakt konf, posvyashch 118-y godovshchine so dnya*

- rozhdeniya akad Nikolaya Ivanovicha Vavilova. Saratov, 2005: 88–90 (in Russian).
20. Rysmukhambetova GYe, Shtyrkova IA, Bukharova YeN, Karpunina LV. Polucheniye polisakharidov iz *Klebsiella pneumoniae*. Vavilovskiye chteniya – 2006: Materialy konf, posvyashch 119-y godovshchine so dnya rozhdeniya Nikolaya Ivanovicha Vavilova. Saratov, 2006: 85–86 (in Russian).
 21. Sorokin AV, Kholyavka MG, Lavlinskaya MS. Sintez i svoystva vodnykh rastvorov graft-sopolimerov khitozana i N-vinilimidazola. Kondensirovannyye sredy i mezhfaznyye granitsy 2021; 23(4):570–577 (in Russian).
 22. Surikova NA. Primeneniye emul'gatorov v khimicheskoy promyshlennosti. Novoye slovo v nauke. Molodezhnyye chteniya. Stavropol': Obshchestvo s ogranichennoy otvetstvennost'yu «Sekvoyaya», 2017: 201–202 (in Russian).
 23. Trapeznikov AA, Zotova KV, Shamrova NV. Mekhanicheskiye svoystva poverkhnostnykh sloyev i poverkhnostnogo natyazheniya rastvorov saponinov. Kolloidnyy zhurnal 1970; 32(3):437–443 (in Russian).
 24. Uryadova GT, Tyapkin AYU, Fokina NA, Karpunina LV. Vydeleniye ekzopolisakharida *Streptococcus thermophilus*. Aktual'nyye problemy veterinarnoy meditsiny, pishchevykh i biotekhnologiy: Materialy Vseros nauchn-prakt konf. Saratov: ITS «Nauka», 2015: 109–113 (in Russian).
 25. Fokina NA, Uryadova LV, Karpunina LV. Vydeleniye ekzopolisakharida iz *Lactococcus lactis* pri razlichnykh usloviyakh kul'tivirovaniya. Agrarnyy nauchnyy zhurnal 2016; 12:40–42 (in Russian).
 26. Shepilo YeA, Sadovoy VV, Trubina IA, Shpak YUV, Shchedrina TV. Issledovaniye molekulyarnoy struktury khitozana i izucheniye vozmozhnosti yego ispol'zovaniya pri proizvodstve myasoproduktov. Sovremennyye perspektivy v issledovanii khitina i khitozana: Materialy Devyatoy mezhdunar konf. Moscow: Izd-vo VNIRO, 2008: 238–240 (in Russian).
 27. Anal AK, Shrestha S, Sadiq MB. Biopolymeric-based emulsions and their effects during processing, digestibility and bioaccessibility of bioactive compounds in food systems. Food Hydrocolloids 2019; 87:691–702.
 28. Chang HW, Tan TB, Tan PY, Nehdi IA, Sbihi HM, Tan CP. Microencapsulation of fish oil-in-water emulsion using thiol-modified β -lactoglobulin fibrils-chitosan complex. J Food Eng 2020; 264:109680. doi:10.1016/j.jfoodeng.2019.07.027.
 29. Cooper DG, Goldenberg BG. Surface-active agents from two *Bacillus* species. Appl and Environ Microbiol 1987; 53(2):224–229.
 30. Feng S, Guo Y, Liu F, Li Z, Chen K, Handa K, Zhang Y. The impacts of complexation and glycated conjugation on the performance of soy protein isolate-gum Arabic composites at the o/w interface for emulsion-based delivery systems. Food Hydrocolloids 2023; 135:108168. doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.108168.
 31. Han W, Long W, Peng L, Zhang W, Shi B. Effect of non-ionic and anionic surfactant on ecotoxicity and micellization behaviors of dodecyl trimethyl ammonium bromide (DTAB). Colloids Surf A Physicochem Eng Asp 2023; 671:131588. doi: 10.1016/j.colsurfa.2023.131588.
 32. Haralampu SG. Resistant starch – a review of the physical properties and biological impact of RS3. Carbohydrate Polymers 2000; 41(3):285–292.
 33. Ji C, Luo Y. Plant protein-based high internal phase Pickering emulsions: Functional properties and potential food applications. J Agr and Food Res 2023; 12:100604. doi: 10.1016/j.jafr.2023.100604.
 34. Kothari D, Das D, Patel S, Goyal A. Dextran and food application. In: Ramawat K., Mérillon J.M. (eds). Polysaccharides. Springer, Cham, 2014:1–16. doi: 10.1007/978-3-319-03751-6_66-1.
 35. Lin J. Genipin crosslinked sugar beet pectin-whey protein isolate/bovine serum albumin conjugates with enhanced emulsifying properties. Food Hydrocolloids 2020; 105:105802. doi: 10.1016/j.food hyd.2020.105802.
 36. Niu H, Hou K, Chen H, Fu X. A review of sugar beet pectin-stabilized emulsion: Extraction, structure, interfacial self-assembly and emulsion stability. Crit Rev Food Sci Nutr 2024; 64(3):852–872.
 37. Paciello S, Russo T, De Marchi L, Soares AMVM, MeucciV, Pretti C, He Y, Della Torre C, Freitas R. Sub-lethal effects induced in *Mytilus galloprovincialis* after short-term exposure to sodium lauryl sulfate: Comparison of the biological responses given by mussels under two temperature scenarios. Comp Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol 2023; 270:109644. doi: 10.1016/j.cbpc.2023.109644.
 38. Rodriguez MS, Albertengo LA, Agulló E. Emulsification capacity of chitosan. Carbohydrate polymers 2002; 48(3):271–276. doi: 10.1016/s0144–8617(01)00258–2.
 39. Rosenberg E, Zuckerberg A, Rubinovitz C, Gutnick DL. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Isolation and emulsifying properties. App and Environ Microbiol 1979; 37(3):402–408.
 40. Toren A, Navon-Venezia S, Ron EZ, Rosenberget E. Emulsifying activities of purified alasin proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. Appl and Environ Microbiol 2001; 67(3):1102–1106.
 41. Toren A, Orr E, Paitan Y, Ron EZ, Rosenberg E. The active component of the bioemulsifier alasin from *Acinetobacter radioresistens* KA53 is an OmpA-like protein. J Bacteriol 2002; 184(1):165–170.
 42. Toren A, Segal G, Ron EZ, Rosenberg E. Structure – function studies of the recombinant protein bioemulsifier AlnA. Environ Microbiol 2002; 4(5):257–261.
 43. Zosim Z, Fleminger G, Gutnick D, Rosenberg E, Wise GS. Effect of protein on the emulsifying activity of emulsan. J Dispers Sci Technol 1989; 10(3):307–317.

EMULSIFYING ABILITY OF POLYSACCHARIDES OF SOME FUNGI AND BACTERIA

O.O. BABICHEVA¹, I.M. ABRAMENKO¹, G.E. RYSMUKHAMBETOVA¹,
N.V. KICHEMAZOVA¹, G.T. URYADOVA², L.V. KARPUNINA¹

¹*Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov, Saratov;*

²*Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov*

In recent years, most industries have adopted the most sustainable and environmentally friendly approach, using various biologically active substances that are safer than synthetic ones. The priority for the use of environmentally friendly bioactive compounds is primarily given to the food industry. In this work, the stabilizing properties of some fungal and bacterial polysaccharides were studied in comparison with commercial emulsifiers. It is shown that the studied biopolymers have emulsifying activity and have a high emulsion potential comparable to commercial emulsifiers. The exopolysaccharides (EPS) of *Streptococcus thermophilus* and polysaccharides (PS) of *Agaricus bisporus* 533, *Pleurotus ostreatus* P-88 have the greatest emulsifying activity in the presence of sunflower oil; with respect to hexane, EPS *Xanthobacter xylophilus* Z-0055, *Lactococcus lactis* B-1662, *S. thermophilus*, *Xanthomonas campestris* B-610/1 and PS *A. bisporus* 508; with respect to kerosene – *P. ostreatus* P-88, *P. ostreatus* NK-35, *A. bisporus* 508, and *A. bisporus* 533 and EPS *X. xylophilus* Z-0055, *L. lactis* B-1662. The use of emulsifiers based on PS of fungal and bacterial origin with their inherent bioactivity can become a worthy alternative to synthetic emulsifiers.

Keywords: fungi; basidiomycetes; bacteria; polysaccharides; exopolysaccharides; xanthanum; lecithin; emulsifying activity; emulsifiers.

Address:

Babicheva O.O.
postgraduate student, Department of Microbiology
and Biotechnology, Saratov State University of genetics,
biotechnology and engineering named after N.I. Vavilov
E-mail: olesya.sultanova.98@mail.ru

Для цитирования:

Бабичева О.О., Абраменко И.М., Рысмукхамбетова Г.Е., Кичемазова Н.В., Урядова Г.Т., Карпунина Л.В. Эмульгирующая способность полисахаридов некоторых грибов и бактерий. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2026; 22(1):43–51.

For citation:

Babicheva O.O., Abramenko I.M., Rysmukhambetova G.E., Kichemazova N.V., Uryadova G.T., Karpunina L.V. Emulsifying ability of polysaccharides of some fungi and bacteria. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2026; 22(1):43–51 (in Russian).

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

А.В. КОМИССАРОВ*, М.В. ОВЧИННИКОВА, О.А. ЛОБОВИКОВА, С.А. БАДАРИН, Д.Н. БИБИКОВ, Н.В. СИНИЦЫНА, Е.А. ГЛАЗКОВА, Г.Н. ГИНЕНКО, А.К. НИКИФОРОВ

ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов

Разработаны методические подходы проведения процедуры герметизации лиофилизатов диагностических препаратов в ампулах в среде инертного газа (азота). Исследована сочетанность влияния следующих параметров машинного проведения процесса герметизации: давление азота, подаваемого внутрь ампул с лиофилизированным препаратом, высота опускания сопел для подачи азота, скорость перемещения транспортера с ампулами. Найдены оптимальные значения этих характеристик. Предложен алгоритм определения герметичности первичной упаковки препаратов, при этом обоснована требуемая величина остаточного кислорода в ампулах. Исследована стабильность свойств препаратов, полученных по экспериментально обоснованным методическим приемам, в процессе хранения при нормируемом сроке годности. Доказана неизменность качества продуктов. Показана эффективность предложенных приемов проведения процесса. Выявлено повышение производительности производства более чем в 6 раз за один технологический цикл.

Ключевые слова: лиофилизаты диагностических препаратов; герметизация ампул запайкой в среде инертного газа; проверка герметичности ампул.

Введение

Технология приготовления лиофилизатов диагностических препаратов в ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора имела ряд ограничений по мощности их выпуска, обусловленных низкой производительностью лиофилизационного оборудования, а также практически 100%-ной физической изношенностью машин, применяемых для герметизации (запайки) ампул (применялись ампулозапаечные аппараты 60-ых годов выпуска прошлого века).

Проведенная в начале 20 годов текущего столетия глубокая реконструкция производственных мощностей приготовления диагностических препаратов, в том числе приобретенного и введенного в эксплуатацию лиофилизационного и запаечного оборудования, позволилократно увеличить производительность одного технологического цикла приготовления. Это, в первую очередь, относится

к препаратам, герметизация которых предусматривает запайку ампул в среде окружающего воздуха.

Существующая технология выпуска ряда диагностических препаратов (иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные и псевдотуберкулезные, иммуноглобулины флуоресцирующие для идентификации *V. cholerae* O1 группы, иммуноглобулины флуоресцирующие для идентификации *V. cholerae* O139 серогруппы) предусматривает герметизацию ампул запайкой под вакуумом. Используемые приемы выполнения данной процедуры позволяют получать ограниченное количество первичных упаковок за один технологический цикл из-за использования низкопроизводительного ручного труда, характеризующегося повышенной вероятностью травматизма (рисунок 1). Альтернативой ручной герметизации ампул под вакуумом может служить машинная запайка ампул в среде инертного газа. Так, из 25 наименований живых вакцин для медицинского применения в форме лиофилизата, производимых в России, 7 герметизируются под вакуумом, 17 — в среде инертного газа, как правило, азота. Исключением является сибиреязвенная живая вакцина, производимая как с герметизацией под вакуумом, так и без него. Необходимо подчеркнуть, что срок годности вакцины без вакуума уменьшен с 4 до 3 лет [2, 5].

Введенное в эксплуатацию ампулозапаечное оборудование позволяет осуществлять процесс герметизации ампул в среде инертного газа.

© 2026 г. Комиссаров А.В., Овчинникова М.В., Лобовикова О.А., Бадарин С.А., Бибииков Д.Н., Синицына Н.В., Глазкова Е.А., Гиненко Г.Н., Никифоров А.К.

* Автор для переписки:

Комиссаров Александр Владимирович
д. биол. наук, профессор, заведующий отделом экспериментальных фармацевтических форм ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
E-mail: Komissarov-9@yandex.ru

В связи с этим проведение теоретических и экспериментальных исследований, направленных на повышение производительности производства диагностических препаратов и снижения его травмоопасности, являются актуальными.

Основными задачами, решаемыми в ходе данной работы, были:

- разработка методических подходов проведения процедуры герметизации лиофилизатов диагностических препаратов в ампулах в среде инертного газа (азота);
- обоснование алгоритма определения герметичности первичной упаковки препаратов;
- исследование стабильности свойств препаратов, полученных по экспериментально обоснованным методическим приемам.

Материалы и методы

При выполнении исследований по разработке методических подходов к этапу герметизации диагностических препаратов в ампулах в среде инертного газа (азота) и алгоритма определения герметичности первичной упа-

ковки использовали иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные адсорбированные лошадиные (ИДФЧ), лиофилизат для диагностических целей, полученные в соответствии с промышленным регламентом на их производство. Объем препарата в ампуле ШП-5 («Курский завод медстекла», Россия) составил 1 мл. Герметизацию диагностических препаратов в ампулах под вакуумом осуществляли ручным способом при величине остаточного давления не менее 100 Па, при запайке ампул в среде инертного газа (азота) применяли моноблок розлива и запайки ампул «Мастер» МЗ-400ЕД («Аврора пак инжиниринг», Россия). Наличие вакуума устанавливали с использованием прибора д'Арсонваля по наличию свечения внутри ампул в соответствии с МУК 4.1/4.2.588-96 [4], измерение остаточного кислорода — газоанализатором ОХУВАВУ® М+ (WITT-Gasetechnik, Германия).

Для исследования свойств лиофилизатов препарата применяли методы, изложенные в ТУ 8961-016-01898109-2007 «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные, адсорбированные лошадиные, лиофилизат для диагностических целей» с изм.



Рис. 1. Проведение технологического процесса запайки ампул под вакуумом

Результаты и обсуждение

Разработка методических подходов проведения процедуры герметизации лиофилизатов диагностических препаратов в ампулах в среде инертного газа (азота)

В технологическом процессе изготовления диагностических препаратов в форме лиофилизатов для розлива и запайки ампул в среде окружающего воздуха успешно с 2020 г. применяется моноблок розлива и запайки ампул «Мастер» МЗ-400ЕД производства «Аврора пак инжиниринг» (Россия).

Принцип работы моноблока заключается в следующем. Ампулы устанавливают в бункер за-

бора ампул, откуда они с помощью привода подачи попадают по транспортеру в зону розлива, где через опускающиеся дозирующие сопла сначала в ампулы подают инертный газ от внешнего источника, а на следующем этапе продукт. После наполнения ампулы перемещаются в зону запайки. После нагрева горловины ампулы специальными захватами удаляют остатки стекла, после чего формируется верхушка ампулы правильной округлой формы. При необходимости операции подачи инертного газа и продукта в ампулы может быть отключены как вместе, так и в отдельности.

Общий вид моноблока представлен на рисунке 2.

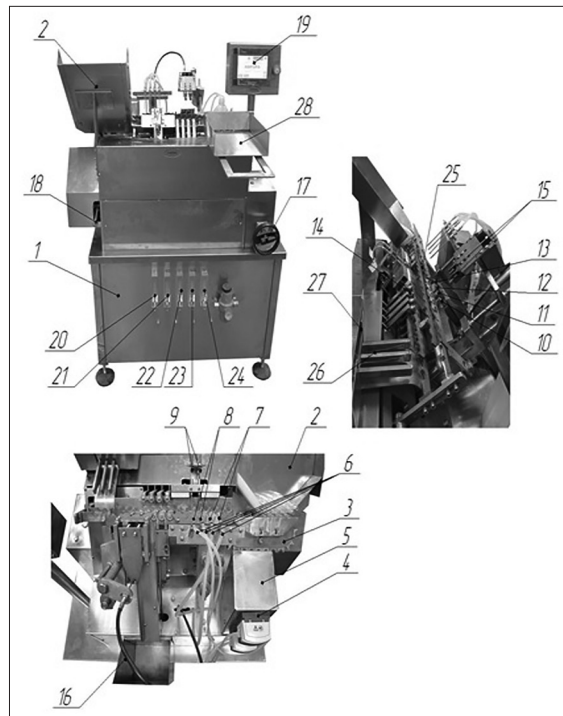


Рис. 2. Общий вид моноблока фасовки и запайки ампул «МАСТЕР» М3-400ЕД.

Основные элементы моноблока: 1 — корпус. Система подачи ампул: 2 — бункер забора ампул; 3 — устройство подачи ампул. Система розлива: 4 — перистальтический насос-дозатор (2 шт.), установленный в корпусе 5; 6 — трубки; 7 — опускающиеся сопла для подачи азота; 8 — опускающиеся сопла для подачи продукта; 9 — датчики наличия ампул. Система запайки: 10, 11 — горелки для окончательной запайки ампул; 12, 13 — горелки для предварительного нагрева ампул; 14 — держатели ампул; 15 — захваты для деликатного удаления остатков стекла; 16 — бункер для удаления остатков стекла. Элементы управления: 17 — ручной привод; 18 — узел блокировки работы моноблока (останавливает подачу ампул, позволяя закончить цикл работы оборудования); 19 — сенсорная панель управления (на панели управления расположено устройство аварийной остановки); 20 — регулировка подачи азота; 21 — регулировка подачи кислорода на горелки 12, 13; 22 — регулировка подачи горючего газа на горелки 12, 13; 23 — регулировка подачи кислорода на горелки 10, 11; 24 — регулировка подачи горючего газа на горелки 10, 11. Система передвижения ампул между технологическими зонами: 25 — транспортер. Система выдачи ампул: 26 — устройство выдачи ампул; 27 — пластина для защиты ампул от падения; 28 — бункер выгрузки

При разработке методических подходов к этапу герметизации диагностических препаратов в ампулах в среде инертного газа (азота) предстояло решить следующие задачи:

- определить величину давления азота, подаваемого внутрь ампул с лиофилизированным препаратом (X , МПа). Величина данного технологического параметра должна быть максимальной, но обеспечивать неразрушение структуры препарата;
- выявить высоту опускания сопел для подачи азота (Y , мм). Также величина данного технологического параметра должна быть максимальной, но обеспечивать неразрушение структуры препарата. В планируемых экспериментах это определялось как расстояние от верхней кромки лиофилизата препарата до нижней кромки сопла;
- опытным путем найти оптимальную скорость перемещения транспортера с ампулами (Z , %), которая

должна обеспечивать, с одной стороны, достаточное время нахождения сопел для максимальной подачи азота внутрь ампулы, а с другой стороны, быть достаточно высокой для того, чтобы азот не вышел из ампулы. На панели управления моноблока данная характеристика отображается в %. Следует сказать, что скорость определяется временем и расстоянием, которое прошла ампула с момента попадания на транспортер до прохождения зоны запайки.

При 100% в абсолютных единицах значение данной величины составляет 14 мм/с.

Для реализации экспериментов исследовали сочетанное влияние вышеуказанных характеристик при следующих их значениях:

X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	Z_1	Z_2	Z_3	Z_4	Z_5	Z_6
0,15	0,1	0,05	10	20	30	100	90	80	70	60	50

Результаты экспериментов по нахождению оптимальных характеристик проведения процесса запайки ампул с диагностическими препаратами в среде инертного газа

Характеристики проведения процесса запайки ампул	Содержание остаточного кислорода, %	Характеристики проведения процесса запайки ампул	Содержание остаточного кислорода, %	Характеристики проведения процесса запайки ампул	Содержание остаточного кислорода, %
X1Y1Z1	ρ	X2Y1Z1	2,72	X3Y1Z1	3,71
X1Y2Z1	2,12	X2Y2Z1	2,9	X3Y2Z1	4,13
X1Y3Z1	2,93	X2Y3Z1	3,23	X3Y3Z1	4,45
X1Y1Z2	ρ	X2Y1Z2	1,84	X3Y1Z2	4,33
X1Y1Z3	ρ	X2Y1Z3	1,67	X3Y1Z3	4,12
X1Y1Z4	ρ	X2Y1Z4	1,51	X3Y1Z4	2,98
X1Y1Z5	ρ	X2Y1Z5	1,91	X3Y1Z5	3,12
X1Y1Z6	ρ	X2Y1Z6	2,17	X3Y1Z6	3,31
X1Y2Z2	2,35	X2Y2Z2	2,71	X3Y2Z2	3,65
X1Y2Z3	2,24	X2Y2Z3	2,62	X3Y2Z3	3,49
X1Y2Z4	1,96	X2Y2Z4	2,23	X3Y2Z4	3,02
X1Y2Z5	2,11	X2Y2Z5	2,41	X3Y2Z5	3,35
X1Y2Z6	2,4	X2Y2Z6	2,76	X3Y2Z6	3,8
X1Y3Z2	2,62	X2Y3Z2	2,94	X3Y3Z2	4,12
X1Y3Z3	2,73	X2Y3Z3	3,11	X3Y3Z3	4,31
X1Y3Z4	2,57	X2Y3Z4	3,07	X3Y3Z4	4,22
X1Y3Z5	2,82	X2Y3Z5	3,34	X3Y3Z5	4,37
X1Y3Z6	3,03	X2Y3Z6	3,52	X3Y3Z6	4,52

Примечание: ρ – разрушение структуры препарата

При условии разрушения структуры препарата или повышения значения величины остаточного кислорода больше 2% (обоснование данного значения приведено ниже), сочетание исследуемых характеристик считали неприменимым.

Результаты экспериментов по нахождению оптимальных вышеуказанных характеристик представлены в таблице 1.

В результате определения исследований оптимальные величины вышеуказанных технологических параметров составили:

- давление азота, подаваемого внутрь ампул с лиофилизированным препаратом – 0,1 МПа;
- высота опускания сопел для подачи азота – 10 мм от верхней кромки лиофилизата препарата;
- скорость перемещения транспортера с ампулами – 70%.

Уменьшение скорости перемещения транспортера с ампулами привело к снижению производительности моноблока розлива и запайки ампул «Мастер» МЗ-400ЕД с 2000 до 1400 ампул в час, но обеспечило требуемое значение остаточного кислорода в первичной упаковке диагностических препаратов – не более 2%.

Проведенные исследования позволили увеличить производительность одного технологического цикла герметизации более чем в 6 раз.

Обоснование алгоритма определения герметичности первичной упаковки препаратов

С целью обоснования методических приемов определения непроницаемости первичной упаковки диагностических препаратов, загерметизированных в среде инертного газа, был проведен анализ нормативной и научно-технической информации по данному вопросу.

Для фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов для медицинского применения актуальной являются общие фармакопейные статьи ОФС.1.4.2.0025 «Определение герметичности упаковки» и ОФС.1.7.1.0018.18 «Иммунобиологические лекарственные препараты» [6, 7]. Анализ данных документов выявил отсутствие описания методических приемов определения непроницаемости первичной упаковки препаратов, загерметизированных в среде инертного газа. Мы считаем это необоснованным в силу того, что значительная часть лекарственных препаратов герметизируется данным способом.

Представлялось целесообразным подвергнуть анализу ГОСТ 27785-2012 «Средства лекарственные биологические лиофилизированные для ветеринарного применения. Метод определения кислорода во флаконах» [1]. Данный документ распространяется на лиофилизированные биологические лекарственные средства для ветеринарного применения и устанавливает хроматографический метод определения объемной доли кислорода во флаконах с препаратом, заполненных азотом и герметично закрытых, в диапазоне измерений от 0,10% до 1,00%. К недостаткам данной методики следует отнести ее невозможность применения к стеклянным ампулам, довольно низкая точность ($\pm 10\%$) и многостадийность выполнения операций (всего 14 операций по подготовке, проведению анализа и вычисления результатов). Кроме того, в изучаемом документе описан только хроматографический метод. Необходимо сказать о том, что описания других методов и методик определения непроницаемости первичной упаковки ветеринарных препаратов, загерметизированных в среде инертного газа, мы не обнаружили.

Анализ двух международных документов: «Принципы приготовления и утверждения международных и других стандартов и эталонных реагентов биологических препаратов, 1990» [3] и «Recommendations for the preparation and establishment of international and other biological reference standards, 2004» [10] выявил отсутствие описания методических приемов определения остаточного кислорода в первичных упаковках препаратов. Однако присутствуют рекомендации по численному значению этой величины — не более 2%. Не все производители биологических препаратов, в том числе российские, придерживаются данной величины. Так, для живой коревой вакцины и вакцины против краснухи значение этого показателя не должно превышать 1% [8, 9].

Необходимость определения непроницаемости первичной упаковки препаратов, загерметизированных в среде инертного газа, регламентирована МУК 4.1/4.2.588-96 «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям» [4]. Там же дается рекомендация по максимальному содержанию остаточного кислорода в первичной упаковке — не более 2%. Необходимо отметить, что статус данного документа, несмотря на его издание в 1996 г., является действующим. Анализ данного документа позволил предложить следующий алгоритм определения герметичности первичной упаковки диагностических препаратов, заключающийся в последовательном выполнении трех основных операций, представленных ниже.

1. 100% контроль ампул серии на герметичность. Для проведения испытаний ампулы и флаконы помещают в кассеты, которые погружают в емкость, заполненную водой, подкрашенной любым водно-растворимым красителем (например, метиленовая синь). Кассеты погружают таким образом, чтобы ампулы и флаконы полностью находились в воде. Емкость герметически закрывают и создают в ней избыточное, по сравнению с атмосферным, давление (100 ± 20) кПа. Это давление выдерживают в течение 20–25 мин, после чего устанавливают в емкости давление, равное атмосферному. Емкость открывают, кассеты с ампулами и флаконами вынимают и просматривают на наличие в них подкрашенной воды. Ампулы и флаконы, содержащие подкрашенную воду, бракуют.

2. Определение выборки ампул, подлежащих инструментальному контролю на наличие остаточного кислорода. Количество ампул каждой серии препарата для контроля определяют по формуле 1:

$$N_K = 0,2\sqrt{N} \quad (1)$$

где N_K — количество ампул, подлежащих контролю, шт.;

N — общее количество ампул в серии препарата, шт.

При этом при машинном способе герметизации следует отбирать образцы из числа последних в каждой кассете.

3. Проведение контроля величины остаточного кислорода. При этом, при обнаружении в выборке хотя бы одной негерметичной ампулы (содержание остаточного кислорода превышает 2%), проводят контроль на удвоенном количестве первичных упаковок серии. При повторном обнаружении хотя бы одной негерметичной ампулы препарата серию бракуют.

Значимым этапом исследований было определение конкретного вида оборудования для проведения инструментального контроля ампул на наличие в них остаточного кислорода. Анализ МУК 4.1/4.2.588-96 [4] позволил их сформулировать следующим образом:

- используемые измерительные устройства должны определять кислород в диапазоне концентраций 0,05–25%;

- точность прибора должна составлять не менее 10,0% от измеряемой величины;

- минимальный объем пробы газа, предназначенный для анализа, должен быть не более 1 см³;

- используемые газоанализаторы должны находиться в Государственном реестре средств измерений и быть поверены.

В качестве средств измерений рекомендовано применять различные газоанализаторы, отвечающие вышеперечисленным требованиям, например, газовый хроматограф, масспектрометры, полярографы. Кроме перечисленных требований немаловажное значение имела цена средства измерения, которая должна быть минимальной. Проведенный мониторинг производителей средств измерений, позволяющих проводить контроль остаточного кислорода в первичной упаковке препаратов, позволил нам остановиться на газоанализаторе ОХУВАВУ® М+, внешний вид и характеристики которого представлены на рисунке 3 и в таблице 2 соответственно. Следует отметить, что цена данного изделия в 2021 г. составила 120000 руб. Для сравнения, цена портативного газового хроматографа начинается от 1000000 руб.



Рисунок 3. Внешний вид газоанализатора ОХУВАВУ® М+

С использованием газоанализатора ОХУВАВУ® М+ было проверено более 2000 первичных упаковок диагностических препаратов, загерметизированных с использованием методических приемов, представленных выше. Проведенный контроль не выявил

ни одной ампулы, подлежащей отбраковке. Содержание остаточного кислорода колебалось от 0,5 до 1,8%.

Представляло определенный научно-практический интерес определение остаточного кислорода в ампулах, запаянных под вакуумом. Исследованиям подвергались арбитражные образцы 5 серий диагностических препаратов после окончания нормируемого срока годности. Нами выявлено, что значение исследуемой характеристики составляет от 3,1 до 4,2%. Между тем проверка контролируемых первичных упаковок по методике, изложенной в главе 12 МУК 4.1/4.2.588-96 [4], показала их соответствие предъявляемым требованиям. Визуальное определение цвета свечения газовой среды ампул с препаратом при возбуждении ее высокочастотным электрическим полем с помощью аппарата типа д>Арсонваль выявило бледно-голубой цвет свечения, что соответствует величине вакуума от 10 до 100 Па и является приемлемым результатом. Полученные данные свидетельствуют о предпочтительности запайки ампул в среде инертного газа в сравнении с герметизацией под вакуумом.

Исследование стабильности свойств препаратов, полученных по экспериментально обоснованным методическим приемам

В соответствии с предложенными методическими приемами герметизации и контроля качества была произведена промышленная серия ИДФЧ, и определены ее характеристики на момент выпуска препарата и по истечении нормируемого срока хранения (2 года). Анализ результатов исследований (таблица 3) позволяет констатировать неизменность свойств. Это дает основание говорить о том, что содержание кислорода на уровне, не превышающем 2% в газовой среде ампулы, не оказывает отрицательного воздействия на характеристики продукта.

Таблица 2

Характеристики газоанализатора ОХУВАВУ® М+

Наименование характеристики	Значение характеристики
Принцип измерения O ₂	электрохимический сенсор
Диапазон измерений	0–25% с шагом 0,1%
Объем газовой пробы	меньше 10 мл
Скорость измерения	не более 10 с
Язык меню	наличие русского языка
Температура газа и окружающей среды	от 5 до 40 °С
Вес	не более 600 г
Размеры	187×106×91 мм
Электропитание	3 встроенных аккумулятора
Зарядное устройство	110–240 В
Пределы допускаемой абсолютной погрешности измерений объемной доли, %: O ₂ , в диапазоне от 0 до 10%	±0,2
Номер в Государственном реестре средств измерений	81804-21

Результаты исследования свойств лиофилизатов ИДФЧ

Показатели	Норма по ТУ 8961-016-01898109-2007	Результаты испытаний	
		На момент выпуска препарата	Препарат после 2 лет хранения
Описание	Аморфная масса оранжевого цвета	соответствует	соответствует
Растворимость	Содержимое ампулы должно полностью растворяться в 1 мл дистиллированной воды в течение 3 мин при встряхивании. После растворения — опалесцирующая жидкость желто-зеленого цвета, без осадка	20 секунд	20 секунд
рН	От 8,0 до 9,5	8,2	8,2
ПМВ	не более 3%	1,5	1,5
Герметизация	Ампулы с препаратом должны быть герметичны Содержание остаточного кислорода не должно превышать 2%	герметичны 1,51–1,77*	герметичны 1,47–1,75*
Белок	От 1 до 2%	1	1
Молярное соотношение ФИТЦ/белок	От 5,0 до 14,0	5,5	5,5
Степень очистки препарата от примеси свободного ФИТЦ	Не должно быть свободного флуорохрома	соответствует	соответствует
Рабочее разведение	Не менее 1:8	1:8	1:8
Специфическая активность	Препарат в рабочем разведении должен вызывать специфическое свечение <i>Y. pestis</i> в концентрации 5×10^8 м.к./мл интенсивностью на 3–4 креста.	соответствует	соответствует
Специфичность	Препарат в рабочем разведении не должен вызывать иммунофлуоресценцию <i>Y. pseudotuberculosis</i> I–VI сероваров и <i>S. sonnei</i> в концентрации 5×10^8 м.к./мл.	соответствует	соответствует

Примечание: * — приведен интервал значений от минимального до максимального; м.к. — микробные клетки; ПМВ — потеря в массе при высушивании; ФИТЦ — флуоресцеин-5-изотиоцианат

Заключение

В результате разработки методических подходов к этапу герметизации диагностических препаратов в ампулах в среде инертного газа (азота) и алгоритма определения остаточного кислорода в первичной упаковке обоснована технология, позволяющая увеличить производительность одного технологического цикла герметизации более чем в 6 раз.

В ходе исследований долгосрочной стабильности свойств препаратов установлено, что в течение установленного срока годности показатели качества продуктов остаются неизменными, что позволило внедрить в производство диагностических препаратов новые методические приемы.

Литература

- ГОСТ 27785-2012. Средства лекарственные биологические лиофилизированные для ветеринарного применения. Метод определения кислорода во флаконах. — Москва: Стандартинформ, 2014. — 6 с.

- Комиссаров А.В., Бибииков Д.Н., Волох О.А., Бадарин С.А., Синецкина Н.В., Костылева Н.И., Германчук В.Г., Никифоров А.К. Лиофилизация живых вакцин // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2018. — Т. 14. — № 3. — С. 56–73.
- Комитет экспертов ВОЗ. Принципы приготовления и утверждения международных и других стандартов и эталонных реагентов биологических препаратов (Серия технических докладов; № 760). — 1990. — С. 38–79.
- МУК 4.1/4.2.588-96. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям // Противоэпидемические мероприятия. Сборник официальных документов. — Москва: «ИНТЭРСЭН», 2006. — Т. 2. — С. 858.
- Никифоров А.К., Комиссаров А.В., Абрамова Е.Г., Волох О.А., Овчинникова М.В., Лобовикова О.А. Твердые лекарственные формы биологических лекарственных препаратов. Вакцины, иммуноглобулины, пробиотики, бактериофаги. — Саратов: ООО Издательство «КУБиК», 2022. — 293 с.
- Общая фармакопейная статья ОФС.1.4.2.0025. Определение герметичности упаковки // Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания [Элек-

- тронный ресурс]. — URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-4/1-4-2/opredelenie-germetichnosti-upakovki/> (дата обращения 20.10.23 г.)
7. ОФС.1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты // Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания [Электронный ресурс]. — URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/1/1-7/1-7-1/immunobiologicheskie-lekarstvennye-preparaty/> (дата обращения 10.11.23 г.)
 8. Юнасова Т.Н., Фадейкина О.В., Сидоренко Е.С., Суханова Л.Л., Шитикова О.Ю., Саркисян К.А., Ильясова Т.Н., Бинятова А.С., Терешкина Н.В., Устинникова О.Б., Волкова Р.А., Мовсесянц А.А., Шведов Д.В. Разработка и изучение отраслевого стандартного образца активности вакцины против краснухи // Биопрепараты. — 2015. — № 3. — С. 49–53.
 9. Юнасова Т.Н., Шитикова О.Ю., Фадейкина О.В., Сидоренко Е.С., Суханова Л.Л., Ильясова Т.Н., Устинникова О.Б., Волкова Р.А., Мовсесянц А.А. Аттестация новой серии отраслевого стандартного образца активности живой коревой вакцины // Биопрепараты. — 2014. — № 3. — С. 40–45.
 10. WHO Expert Committee on biological standardization. Recommendations for the preparation and establishment of international and other biological reference standards // WHO Technical Reports Series. — 2004. — No. 932(Annex 2). — P. 73–131.
- References**
1. GOST 27785-2012. Sredstva lekarstvennyye biologicheskiye liofilizirovannyye dlya veterinarnogo primeneniya. Metod opredeleniya kisloroda vo flakonakh. Moscow: Standartinform, 2014. 6 z (in Russian).
 2. Komissarov AV, Bibikov DN, Volokh OA, Badarin SA, Sinitsyna NV, Kostyleva NI, Germanchuk VG, Nikiforov AK. Liofilizatsiya zhivyykh vaksyn. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova 2018; 14(3):56–73 (in Russian).
 3. Komitet ekspertov VOZ. Printsipy prigotovleniya i utverzhdeniya mezhdunarodnykh i drugikh standartov i etalonykh reagentov biologicheskikh preparatov (Seriya tekhnicheskikh dokladov; № 760), 1990: 38–79 (in Russian).
 4. MUK 4.1/4.2.588-96. Metody kontrolya meditsinskikh immunobiologicheskikh preparatov, vvodimyykh lyudyam. Protivoepidemicheskiye meropriyatiya. Sbornik ofitsial'nykh dokumentov. Moscow: «INTERSEN», 2006; 2:858 (in Russian).
 5. Nikiforov AK, Komissarov AV, Abramova YeG, Volokh OA, Ovchinnikova MV, Lobovikova OA. Tverdyye lekarstvennyye formy biologicheskikh lekarstvennykh preparatov. Vaksiny, immunoglobuliny, probiotiki, bakteriofagi. Saratov: OOO Izdatel'stvo «KUBiK», 2022: 293 (in Russian).
 6. Obshchaya farmakopeynaya stat'ya OFS.1.4.2.0025. Opredeleniye germetichnosti upakovki. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii XV izdaniya. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-4/1-4-2/opredelenie-germetichnosti-upakovki/> (date of access 20.10.23 g) (in Russian).
 7. OFS.1.7.1.0018.18 Immunobiologicheskiye lekarstvennyye preparaty. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii XV izdaniya. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/1/1-7/1-7-1/immunobiologicheskie-lekarstvennye-preparaty/> (date of access 10.11.23 g) (in Russian).
 8. Yunasova TN, Fadeykina OV, Sidorenko YeS, Sukhanova LL, Shitikova OYu, Sarkisyan KA, Il'yasova TN, Binyatova AS, Tereshkina NV, Ustinnikova OB, Volkova RA, Movsesyants AA, Shvedov DV. Razrabotka i izucheniye otraslevogo standartnogo obraztsa aktivnosti vaksiny protiv krasnukhi. Biopreparaty 2015; 3:49–53 (in Russian).
 9. Yunasova TN, Shitikova OYu, Fadeykina OV, Sidorenko ES, Sukhanova LL, Ilyasova TN, Ustinnikova OB, Volkova RA, Movsesyants AA. Attestatsiya novoy serii otraslevogo standartnogo obraztsa aktivnosti zhivoy korevoy vaksiny. Biopreparaty 2014; 3:40–45 (in Russian).
 10. WHO Expert Committee on biological standardization. Recommendations for the preparation and establishment of international and other biological reference standards. WHO Technical Reports Series 2004; 932(Annex 2):73–131.

INTENSIFICATION OF PRODUCTION OF DIAGNOSTIC IMMUNOBIO-LOGICAL PREPARATIONS

A.V. KOMISAROV, M.V. OVCHINNIKOVA, O.A. LOBOVIKOVA, S.A. BADARIN, D.N. BIBIKOV, N.V. SINITSYNA, E.A. GLAZKOVA, G.N. GINENKO, A.K. NIKIFOROV

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

We have developed methodological approaches to sealing of lyophilizates of diagnostic drugs in ampoules in an inert gas (nitrogen) environment. Combined effect of the following parameters of automated sealing process was studied: the pressure of nitrogen supplied inside the ampoules with a lyophilized drug; the height of lowering the nozzles for supplying nitrogen; the speed of movement of the

conveyor with ampoules. The optimal values of these characteristics have been found. An algorithm for determining the tightness of the primary packaging of drugs is proposed; thereat, required amount of residual oxygen in the ampoules is established. The stability of the properties of drugs, obtained using the experimentally substantiated methodological techniques, was investigated during storage over a standardized shelf life. The consistency of product quality has been proven. The effectiveness of the proposed methods for carrying out the sealing has been demonstrated. An increase in production capacity by more than 6 times in one technological cycle is observed.

Keywords: lyophilizates of diagnostic drugs; sealing of ampoules by soldering in an inert gas environment; checking the tightness of ampoules.

Address:

Komissarov A.V., Doctor of Biological Sciences
professor, head of the department of experimental
pharmaceutical formulations, Russian Anti-Plague Institute
«Microbe» of Rospotrebnadzor
E-mail: komissarov-9@yandex.ru

Для цитирования:

Комиссаров А.В., Овчинникова М.В., Лобовикова О.А., Бадарин С.А., Бибииков Д.Н., Синицына Н.В., Глазкова Е.А., Гиненко Г.Н., Никифоров А.К. Интенсификация производства диагностических иммунобиологических препаратов. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2026; 22(1):52–60.

For citation:

Komissarov A.V., Ovchinnikova M.V., Lobovikova O.A., Badarin S.A., Bibikov D.N., Sinitsyna N.V., Glazkova E.A., Ginenko G.N., Nikiforov A.K. Intensification of production of diagnostic immunobiological preparations. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2026; 22(1):52–60 (in Russian).

УДК: 579.843:579:577.21:615.33

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

М.М. САГАКЯНЦ*, О.А. ПОДОЙНИЦЫНА, В.В. АГАФОНОВА, О.А. ЦЫРУЛИНА,
М.В. ПОЛЕЕВА, В.А. ЛЫЧМАН, А.Ю. КАРНАУХОВ

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

Vibrio parahaemolyticus является одной из основных причин острого кишечного заболевания, протекающего по типу пищевой токсикоинфекции, связанной с употреблением в пищу сырых или недостаточно термически обработанных морепродуктов. В настоящее время в мире регистрируются *V. parahaemolyticus*, выделенные от человека и изолированные из объектов окружающей среды, для которых фиксируется нарастание антибиотикорезистентности и формирование множественной устойчивости. Цель данного исследования — оценка спектра антибиотикоустойчивости/чувствительности и поиск маркеров (генов) антибиотикорезистентности штаммов *V. parahaemolyticus*. Были изучены 108 коллекционных штаммов *V. parahaemolyticus*. Чувствительность к антибактериальным препаратам определяли диско-диффузионным методом. Проводили полногеномное секвенирование на основе технологии next generation sequencing, поиск генов антибиотикорезистентности осуществляли с помощью программы Abicate 1.0.1, в качестве базы данных использовался Resfinder. Для всех исследуемых штаммов *V. parahaemolyticus* установлено наличие устойчивости к одному антибактериальному препарату — 85,7% клинических штаммов и 62,7% штаммов из объектов окружающей среды (ООС); 14,3% клинических штаммов и 33,9% из ООС были резистентны к двум антибактериальным препаратам. Несколько штаммов *V. parahaemolyticus* из ООС (3,4%) проявили устойчивость одновременно к трём антибактериальным препаратам. Устойчивости более чем к трем антибактериальным препаратам не выявлено. Показано, что штаммы из ООС демонстрируют фенотипическую устойчивость к двум/трем антибактериальным препаратам почти в три раза чаще, чем *V. parahaemolyticus*, имеющие клиническое происхождение. Гены β -лактамаз класса А выявлены у 100% штаммов, что коррелирует с их устойчивостью к ампициллину. У всех штаммов установлено наличие генов *tet34* и *tet35*, обуславливающих устойчивость к тетрациклину, но при этом установлена чувствительность к данному антибактериальному препарату. Можно предположить, что гены *tet34* и *tet35* в данном случае выполняют другую функцию, вероятно связанную с метаболической активностью паразитических вибрионов.

Ключевые слова: *Vibrio parahaemolyticus*; антибактериальный препарат; резистентность к антибиотикам; полногеномное секвенирование.

Введение

Vibrio parahaemolyticus — это грамотрицательные галофильные бактерии, обитающие в прибрежных морских и эстуарных водах в свободноживущей форме или в органах и тканях рыб и других гидробионтов (моллюсков, ракообразных, губок, кораллов и др.). Употребление человеком в пищу сырых или недостаточно термически обработанных морепродуктов, контаминированных эти-

ми галофильными вибрионами, ведет к возникновению спорадических случаев или эпидемических вспышек острого кишечного заболевания, протекающего по типу пищевой токсикоинфекции.

В последние годы продолжается регистрация *V. parahaemolyticus*, выделенных от человека и изолированных из объектов окружающей среды (ООС) в разных странах мира — Канаде, США, Мексике, России, странах Западной Европы, Юго-Восточной Азии, Африки, Австралии, Новой Зеландии [3, 7, 8, 14, 17, 18, 20, 21, 23, 29].

Практически все паразитические вибрионы чувствительны к антибактериальным препаратам (АБП), традиционно рекомендуемым для лечения и профилактики заболеваний, вызванных *Vibrio* spp. Однако в последнее время встречается достаточно много сообщений о нарастании антибиотикорезистентности

© 2026 г. Сагакянц М.М., Подойницына О.А., Агафонова В.В., Цырулина О.А., Полеева М.В., Лычман В.А., Карнаухов А.Ю.

* Автор для переписки:

Сагакянц Маргарита Мардиросовна
научный сотрудник лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

E-mail: margasagak@rambler.ru

и формировании множественной устойчивости у *V. parahaemolyticus*, возникающей в результате чрезмерного воздействия антибиотиков на организм человека, неправомерного использования их в сельском хозяйстве и в системах аквакультур. При этом в мире регистрируются высокие уровни устойчивости вибрионов к лекарственным препаратам, когда до 70% изолятов показывают мультирезистентность к 10 и более препаратам [1, 15]. Например, в публикации Parthasarathy S. et al. (2021 г.) при изучении *V. parahaemolyticus* (n=71), выделенных из устриц, были обнаружены штаммы, устойчивые к 6 АБП из 14 тестированных препаратов [24]. Анализ спектра антибиотикоустойчивости/чувствительности штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных из морской воды и гидробионтов (двустворчатых моллюсков, голотурий, морских ежей, морских звёзд, асцидий, водорослей, морской травы) в заливе Петра Великого Японского моря (n=29) показал наличие резистентности к 8 АБП из 15, а в заливе Нячанг Южно-Китайского моря паразитические вибрионы (n=23), выделенные также из морской воды и гидробионтов (водорослей разных видов, устриц, асцидий, усонюгих раков и др.), были устойчивы к 10 из 15 АБП [1]. Также есть данные, которые свидетельствуют о том, что резистентность у бактерий возникает из-за субингибирующих концентраций антибиотиков, которые в 200 раз ниже минимальной ингибирующей концентрации, и, по распространенному мнению, при попадании антибиотиков в окружающую среду, быстро разлагаются, не оказывая негативного влияния. Тем не менее, они все же могут вызывать селекцию антибиотикорезистентности (вызывать SOS-ответ) и даже развитие полирезистентных условно-патогенных и патогенных микроорганизмов [10, 12, 26].

Проблема антибиотикорезистентности рассматривается в качестве глобальной экологической катастрофы рядом общественных организаций, таких как ВОЗ и Центры по контролю и профилактике заболеваний (Centers for Disease Control and Prevention — CDC), что способствует разработке стратегических документов, направленных на предупреждение и сдерживание распространения антибиотикорезистентности [2]. Так, Россия вступила в программу борьбы с микробной антибиотикорезистентностью (МАР) в 2017 г., утвердив Стратегию предупреждения распространения МАР в Российской Федерации (РФ) на период до 2030 г. [5]. Также 30 декабря 2020 г. был принят закон № 492-ФЗ «О биологической безопасности в Российской Федерации», где распространение антибиотикорезистентности относится к основным угрозам биологической безопасности [9].

В связи с вышеизложенным, актуальным представляется мониторинг нарастания устойчивости к АБП у штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных от человека и гидробионтов, имеющих промышленное значение.

Цель работы: оценка спектра антибиотикоустойчивости/чувствительности и поиск маркеров (генов) антибиотикорезистентности у штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных от людей и из ООС.

Материалы и методы

В работе было исследовано 108 коллекционных штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных в разные годы с 1972 г. по 2020 г. из клинического материала (49 штаммов) и из ООС — морской воды, речной воды, балластной воды, гидробионтов — устрицы, рыбы (59 штаммов) на территории Российской Федерации (103 штамма), Японии (два штамма от человека, 1951 г. и 1971 г.) и Туркмении (три штамма от вибрионосителей в 1985 г.).

Антибиотикочувствительность изучали диско-диффузионным методом, где в качестве носителей АБП использовали набор дисков индикаторных картонных с противомикробными лекарственными средствами ДИ-ПАС-50-01 по ТУ 9398-001-39484474-2000, ООО «НИЦФ» (г. Санкт-Петербург, Россия). Исследование проводили согласно действующим методическим указаниям МУК 4.2.2495-09 [4] на среде Мюллера-Хинтона к препаратам, рекомендованным для экстренной профилактики и лечения холеры: бета-лактамам (ампициллин, цефтриаксон, цефотаксим); аминогликозидам (стрептомицин, канамицин, гентамицин, тобрамицин, нетилмицин, амикацин); ингибиторам ДНК-гиразы — хинолонам (налидиксовая кислота) и фторхинолонам (норфлоксацин, пefлоксацин, цiproфлоксацин, офлоксацин, ломефлоксацин, левофлоксацин); тетрациклинам (доксциклин, тетрациклин); сульфаниламидам (триметоприм/сульфаметоксазол); нитрофуранам (фуразолидон); рифамицинам (рифампицин); амфениколам (левомицетин).

Интерпретацию результатов определения чувствительности/устойчивости штаммов *V. parahaemolyticus* проводили в соответствии с пограничными значениями диаметров зон подавления роста вибрионов, в результате чего были выявлены чувствительные (S), устойчивые (R) и промежуточные (умеренно устойчивые) (I) штаммы. В качестве контрольных штаммов были использованы штаммы *V. cholerae* non O1/non O139 № P-9741 и *E. coli* ATCC 25922.

Азитромицин не входит в перечень АБП, регламентированных для лечения и профилактики заболеваний, вызываемых *V. cholerae*. Однако в современных реалиях широкого распространения новых инфекционных заболеваний целесообразным может являться включение азитромицина в перечень АБП для изучения антибиотикограммы *V. parahaemolyticus*. В связи с отсутствием в нормативных документах РФ критериев интерпретации результатов исследования вибрионов значений диаметров зон подавления роста для азитромицина, использовали рекомендации EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам) «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия 2021-01» [6].

Полногеномное секвенирование на основе технологии next generation sequencing (NGS) проводили на платформе MiSeq (Illumina, США) с применением набора «Illumina® DNA Prep» (Illumina, США). Сборку геномов, представленных в виде ридов, проводили с использованием программы Spades [11]. Гены антибиотикорезистентности выявляли с помощью программы Abricate 1.0.1, в качестве базы данных использовался Resfinder

[27, 33]. Для анализа генов антибиотикорезистентности использовали нуклеотидные последовательности референсных штаммов *V. parahaemolyticus*, представленных в базе данных NCBI GenBank.

Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлены результаты определения чувствительности/устойчивости штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных от человека и из ООС. При расшифровке антибиотикограмм клинических штаммов *V. parahaemolyticus*, была выявлена 100% устойчивость к ампициллину, в то время как отношение к другим представителям класса β-лактамов было неоднородным — к цефтриаксону наблюдалась 100% чувствительность, а к цефотаксиму наблюдалась чувствительность в 84% случаев.

Среди аминогликозидов устойчивость была обнаружена лишь к канамицину у 12% штаммов *V. parahaemolyticus*. В отношении других представителей данного класса АБП клинические штаммы паразитических вибрионов были чувствительны — к стрептомицину (100%) и амикацину (100%), а к гентамицину, тобрамицину, нетилмицину соответственно 90%, 94%, 92%.

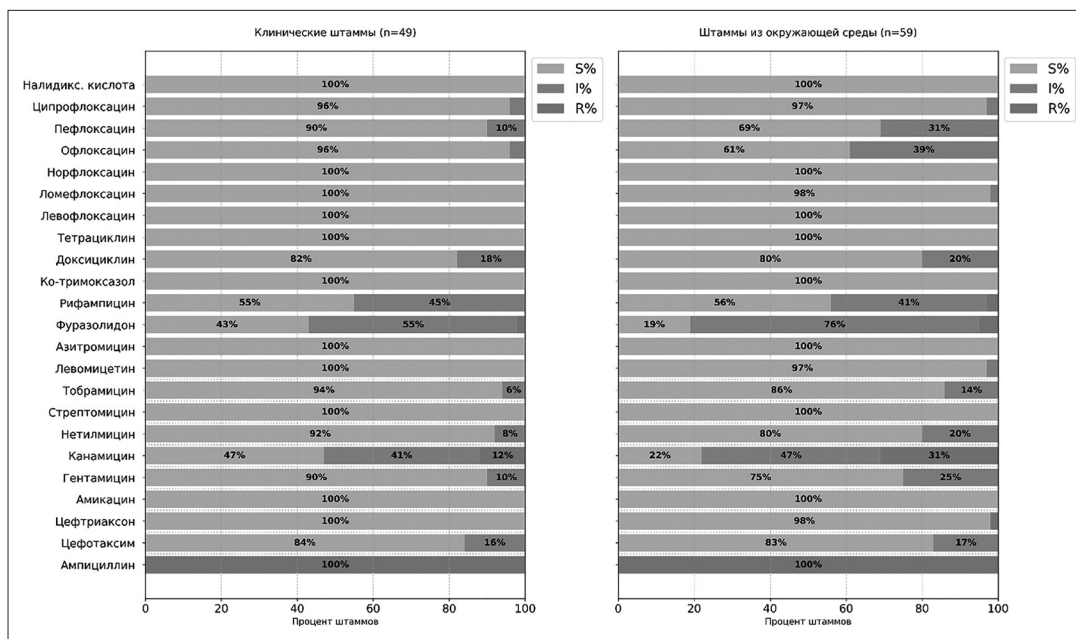


Рис. 1. Профили антибиотикорезистентности клинических штаммов (n=49) и штаммов из окружающей среды (n=59) *V. parahaemolyticus*. S — чувствительные штаммы, I — штаммы с промежуточной резистентностью, R — резистентные штаммы

Также была установлена 100% чувствительность к налидиксовой кислоте, азитромицину, триметоприм/сульфаметоксазолу, левомецетину, тетрациклину. Изоляты, полученные от людей, оказались чувствительны к

представителям класса фторхинолонов - норфлоксацину, ломефлоксацину, левофлоксацину, ципрофлоксацину, офлоксацину и пефлоксацину (от 90 до 100%). Высокая доля клинических штаммов *V. parahaemolyticus*

имела «промежуточную устойчивость» к фуразолидону и рифампицину (55% и 45% соответственно).

Штаммы *V. parahaemolyticus*, выделенные из ООС, обладали большим спектром антибиотикорезистентности. Анализ антибиотикограмм показал резистентность к ампициллину (100%), канамицину (31%), к фуразолидону (5%), рифампицину (3%), цефтриаксону (2%). При этом указанные штаммы *V. parahaemolyticus* в 100% случаев были чувствительны к стрептомицину, амикацину, налидиксовой кислоте, норфлоксацину, левофлоксацину, азитромицину, тетрациклину, триметоприм/сульфаметок-

сазолу. В отличие от клинических изолятов, среди культур, выделенных из ООС, наблюдалось большое число штаммов с промежуточной устойчивостью к гентамицину (25%), канамицину (47%), офлоксацину (39%), доксициклину (20%), фуразолидону (76%), рифампицину (41%).

Таким образом, удалось установить наличие резистентности к 5 АБП из 23. Устойчивостью к трем АБП обладали два штамма, оба были изолированы из ООС в 2019 г. и в 2020 г. Штаммов с множественной лекарственной устойчивостью (к четырем и более АБП) не обнаружено (таблица 1).

Таблица 1

Фенотипические профили антибиотикорезистентности штаммов *V. parahaemolyticus*

№ п/п	Профили антибиотикорезистентности	Число маркеров	Количество штаммов	
			клинические (n=49)	из ООС (n=59)
1	AMP	1	42 (85,71 %)	37 (62,7 %)
2	AMP, CRO	2	0	1 (1,7 %)
3	AMP, KAN	2	6 (12,24 %)	16 (27,1 %)
4	AMP, FUR	2	1 (2,04 %)	1 (1,7 %)
5	AMP, RIF	2	0	2 (3,4 %)
6	AMP, KAN, FUR	3	0	2 (3,4 %)

Примечание: AMP – ампициллин, CRO – цефтриаксон, KAN – канамицин, FUR – фуразолидон, RIF – рифампицин

С 1951 г. по 2017 г. из клинического материала выделялись штаммы с устойчивостью к одному/двум АБП. Устойчивость к двум препаратам демонстрировали штаммы, выделенные в 1973–1974 гг., 2012 г. и 2017 г. Штаммов, проявляющих резистентность к трем и более АБП, выявлено не было.

В период с 1972 г. по 2020 г. из ООС были изолированы штаммы, резистентные к одному (62,7%), двум (33,9%) либо трем (3,4%) АБП. Вибрионы, выделенные

из ООС, демонстрировали устойчивость к нескольким АБП чаще, чем выделенные из клинического материала. Штаммы, устойчивые к действию двух АБП, выявлялись в 1972 г, 1997 г., 2012–2015 гг., 2018–2020 гг. Необходимо отметить, что оба штамма, проявляющие устойчивость к трем АБП, были выделены в 2019 г. и в 2020 г.

Результаты исследования маркеров антибиотикорезистентности штаммов *V. parahaemolyticus* с помощью NGS представлены в таблице 2.

Таблица 2

Гены устойчивости к АБП, обнаруженные у штаммов *V. parahaemolyticus*

Наименование гена	Номер последовательности в базе NCBI	Количество штаммов, у которых обнаружен ген		Функция	Ссылка
		клинические	из ООС		
<i>tet(34)_1</i>	AB061440	49	59	Устойчивость к тетрациклину	[28]
<i>tet(35)_1</i>	AF353562	49	59	Устойчивость к тетрациклину	[22]
<i>txr</i>	AF353562.1	0	0	Устойчивость к тетрациклину	[25]
<i>aadA15_1</i>	DQ393783	0	1	Устойчивость к стрептомицину	[32]
<i>catB4_1</i>	EU935739	0	3	Устойчивость к хлорамфениколу (левомицетину)	[31]
<i>blaCARB-47_1</i>	NG050564	46	51	Устойчивость к β -лактамам	[19]
<i>blaCARB-48_1</i>	NG050604	3	8	Устойчивость к β -лактамам	[19]
<i>blaCARB-17</i>	KJ934265.1	0	0	Устойчивость к β -лактамам	[13]
<i>qnrS5_1</i>	HQ631377	1	1	Устойчивость к фторхинолонам	[16]
<i>qnrC_1</i>	EU917444	1	0	Устойчивость к фторхинолонам	[30]

У всех исследуемых штаммов *V. parahaemolyticus* был обнаружен ген *tet35*, который, согласно литературным данным, совместно с геном *txr* (AF353562.1) способствует устойчивости к тетрациклину. Белок Txr может потребоваться для взаимодействия с Tet35, чтобы обеспечить надлежащее функционирование Tet35 [25, 28]. Однако исследуемые нами штаммы *парагемолитических вибрионов* в 100% случаев были фенотипически чувствительны к тетрациклину и в некоторых случаях проявляли промежуточную устойчивость к доксициклину (18% — клинические штаммы, 20% — изоляты из ООС).

Нами был осуществлен поиск нуклеотидной последовательности гена *txr* у штаммов *V. parahaemolyticus*, и установлено, что данный ген у всех рассматриваемых в данной работе вибрионов отсутствует. Возможно, чувствительность *парагемолитических вибрионов* к тетрациклину связана с отсутствием белка Txr. В исследованиях, рассматривающих поглощение и выведение тетрациклина бактериальными клетками, было показано, что *E. coli*, содержащие *tet35* и *txr*, могут функционировать в качестве энергозависимого насоса для выведения тетрациклина, но в то же время считается, что гены устойчивости к антимикробным препаратам, возможно, эволюционировали для защиты бактерий от различных токсинов окружающей среды или для транспортировки физиологических соединений, и что способность выводить лекарства является лишь случайным побочным эффектом. Был описан многофункциональный антипортер Tet(A)L *B. subtilis*, который катализирует металлтетрациклин/ H^+ -антипорт, а также Na^+/H^+ и K^+/H^+ -антипорт. Он играет физиологическую роль, обеспечивая транспорт Na^+ и постоянство pH, а также придает организму устойчивость к тетрациклину [28]. Аналогичную роль можно предположить и для Tet35: его основной функцией может быть не транспортировка тетрациклина. Наличие гена *tet35* у всех исследуемых штаммов *V. parahaemolyticus* и одновременно с этим отсутствие устойчивости штаммов к тетрациклину позволяет предположить, что основная роль Tet35 — физиологическая, связанная с Na^+/H^+ — антипортером.

Помимо гена *tet35* у всех исследуемых *V. parahaemolyticus* был обнаружен ген *tet34* (AB061440), также способный обеспечивать устойчивость к тетрациклину. Установлено сходство белковых последовательностей между Tet34 и несколькими бактериальными ксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазами (XPRTS), которые катализируют образование гуанозинмонофосфата из гуанина, что позволяет предположить, участие Tet34 в обеспечении клетки пуриновыми нуклеотидами [22].

Возможно, наличие одного или обоих генов *tet34* и/или *tet35* обеспечивает промежуточную устойчивость к док-

сициклину у 18–20% штаммов, однако основной функцией этих генов для *V. parahaemolyticus* вероятно является участие их продуктов в обеспечении жизнедеятельности клеток.

Антибиотиком, к которому все исследуемые штаммы *V. parahaemolyticus* проявили резистентность, оказался ампициллин, относящийся к широкому классу β -лактамов, механизм действия которых заключается в блокаде синтеза пептидогликана.

Гены blaCARB (от англ. beta-lactamase, carbencillinase) кодируют β -лактамазы, обеспечивающие устойчивость к пенициллинам, но не к карбапенемам или поздним цефалоспорином. Ген *blaCARB-17* (KJ934265.1), придающий штаммам устойчивость к пенициллинам, был предложен в качестве видового маркера [13, 19]. Среди исследуемых нами штаммов ген *blaCARB-17* обнаружен не был, но установлено наличие последовательностей *blaCARB-47* (89,8% штаммов) и *blaCARB-48* (10,2% штаммов); номера в GenBank: NG050564 и NG050604 соответственно. Сходство нуклеотидных последовательностей *blaCARB-47* и *blaCARB-48* составило 99%, размер обоих генов — 1052 п.н. (размер *blaCARB-17* - 852 п.н.).

Генов, обеспечивающих резистентность к канамицину, фуразолидону и рифампицину обнаружено не было, несмотря на то, что фенотипическая резистентность штаммов *V. parahaemolyticus* к этим препаратам была выявлена.

Заключение

В результате проведенного исследования для всех исследуемых штаммов *V. parahaemolyticus* установлено наличие устойчивости к одному антибактериальному препарату (АБП) — 85,7% клинических штаммов и 62,7% штаммов из ООС; 14,3% клинических штаммов и 33,9% — из ООС были устойчивы к двум АБП. Несколько штаммов *V. parahaemolyticus* из ООС (3,4%) проявили устойчивость одновременно к трем АБП. Устойчивости более чем к трем АБП не выявлено.

Штаммы из ООС демонстрируют фенотипическую устойчивость к двум/трем АБП почти в три раза чаще, чем *V. parahaemolyticus*, имеющие клиническое происхождение. Вероятно, это связано с тем, что гены, придающие штаммам резистентность к АБП, обеспечивают также выживаемость в условиях окружающей среды.

Гены β -лактамаз класса А выявлены у 100% штаммов, что коррелирует с их устойчивостью к ампициллину. Вместе с тем, у всех штаммов установлено наличие генов *tet34* и *tet35*, обуславливающих устойчивость к тетрациклину, но при этом для всех исследуемых штаммов

установлена чувствительность к данному АБП. Можно предположить, что гены *tet34* и *tet35* в данном случае выполняют другую функцию, возможно связанную с метаболической активностью параземолитических вибрионов.

Таким образом, выявленное наличие устойчивости у штаммов *V. parahaemolyticus* к широкому спектру антибактериальных препаратов, которые рекомендованы для лечения острых кишечных инфекций, может говорить о затруднениях при выборе эффективных средств этиотропной терапии.

Литература

- Беленева И.А. Вибриофлора гидробионтов и воды заливов Петра Великого (Японское море) и Нячанг (Южно-китайское море) // Биология моря. — 2020. — Т. 46. — № 5. — С. 338–348.
- Давидович Н.В., Кукалевская Н.Н., Башилова Е.Н., Бажукова Т.А. Основные принципы эволюции антибиотикорезистентности у бактерий (обзор литературы) // Клиническая лабораторная диагностика. — 2020. — Т. 65. — № 6. — С. 387–393.
- Кругликов В.Д., Гаевская Н.Е., Монахова Е.В., Москвитина Э.А., Агафонова В.В., Савина И.В., Подойницына О.А., Селянская Н.А., Водопьянов А.С., Дуванова О.В., Меньшикова Е.А., Ежова М.И., Шипко Е.С., Евтеев А.В., Казьмина В.С., Бодрая П.В., Сокиркина Е.Н. Анализ особенностей эпидемиологической ситуации по холере в 2024 г. в мире, в Российской Федерации и прогноз ее развития на 2025 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2025. — № 1. — С. 35–47.
- МУК 4.2.2495-09. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллёз, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам. Методические указания. — Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. — 59 с.
- Распоряжение Правительства Российской Федерации от 25.09.2017 № 2045-р «Об утверждении Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года и плана мероприятий по ее реализации с проектом доклада Президенту Российской Федерации по данному вопросу» [Электронный ресурс]. — URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001201710030067?index=2> (дата обращения 03.04.2025).
- Рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» Версия 2021–01. EUCAST [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.antibiotic.ru.>files/321/clrec-dsma.2021.pdf>. (дата обращения 03.04.2025).
- Рыковская О.А. Молекулярно-биологическая характеристика и совершенствование идентификации и дифференциации *Vibrio parahaemolyticus* и *Vibrio alginolyticus*: Дис... канд. биол. наук. — Ростов-на-Дону, 2016. — 144 с.
- Смоликова Л.М., Ломов Ю.М., Хоменко Т.В., Мурначев Г.П., Кудрякова Т.А., Фещайлова О.П., Санамянц Е.М., Македонова Л.Д., Качкина Г.В., Голенищева Е.Н. Галофильные вибрионы, вызвавшие вспышку пищевых токсикоинфекций в г. Владивостоке // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии. — 2001. — Т. 6. — С. 3–7.
- Федеральный закон от 30.12.2020 № 492-ФЗ «О биологической безопасности Российской Федерации» [Электронный ресурс]. — URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202012300021> (дата обращения 03.04.2025).
- Циркунова Ж.Ф., Емельянова А.А., Гудкова Е.И., Скороход Г.А., Буткевич В.В., Слабко И.Н., Бердник Н.Н., Гаврилова И.А. Влияние субингибирующих концентраций биоцидов на формирование адаптивной устойчивости клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2022. — № 3. — С. 30–39.
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // J. Computat. Biol. — 2012. — Vol. 19. — No. 5. — P. 455–477.
- Berglund B. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics // Infect. Ecol. Epidemiol. — 2015. — No. 5. — Art. 28564. doi: 10.3402/iee.v5.28564.
- Chiou J., Li R., Chen S. CARB-17 family of β -lactamases mediates intrinsic resistance to penicillins in *Vibrio parahaemolyticus* // Antimicrob Agents Chemother. — 2015. — Vol. 59. — No. 6. — P. 3593–3595.
- Chowdhury A., Ishibashi M., Thiem V.D., Tuyet D.T., Tung T.V., Chien B.T., Seidlein Lv.Lv., Canh D.G., Clemens J., Trach D.D., Nishibuchi M. Emergence and serovar transition of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1999 // Microbial. Immunol. — 2004. — Vol. 48. — No. 4. — P. 319–327.
- Elmahdi S., DaSilva L.V., Parveen S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: A review // Food Microbiol. — 2016. — Vol. 57. — P. 128–134.
- Han J.E., Kim J.H., Cheresca C.H., Jr., Shin S.P., Jun J.W., Chai J.Y., Han S.Y., Park S.C. First description of the *qnrS*-like (*qnrS5*) gene and analysis of quinolone resistance-determining regions in motile *Aeromonas* spp. from diseased fish and water // Res. Microbiol. — 2012. — Vol. 163. — No. 1. — P. 73–79.

17. Igbinsola E.O., Beshiru A., Igbinsola I.H., Ogoofure A.G., Uwhuba K.E. Prevalence and characterization of food-borne *Vibrio parahaemolyticus* from African Salad in Southern Nigeria // *Front. Microbiol.* – 2021. – Vol. 12. – Art. 632266. doi: 10.3389/fmicb.2021.632266.
18. Li B.S., Li J.H., Liang D.M., He B.X., Ke M.Z., Liu Y., Long H.P., Dong H. Epidemiological and etiological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* strains causing foodborne disease outbreaks in Guangdong Province from 2017 to 2020 // *Chinese J. Preventive Med.* – 2022. – Vol. 56. – No. 4. – P. 443–447.
19. Li P., Liu C., Li B., Ma Q. Structural analysis of the CARB β -lactamase from *Vibrio parahaemolyticus* facilitates application of the β -lactam/ β -lactamase inhibitor therapy // *Biochimie.* – 2020. – Vol. 171–172. – P. 213–222.
20. Martinez-Urtaza J., Trinanés J., Abanto M., Lozano-Leon A., Llovo-Taboada J., Garcia-Campello M., Pousa A., Powell A., Baker-Austin C., Gonzalez-Escalona N. Epidemic dynamics of *Vibrio parahaemolyticus* illness in a 174 hotspot of disease emergence, Galicia, Spain // *Emerg. Infect. Dis.* – 2018. – Vol. 24. – No. 5 – P. 852–859.
21. Newton A., Kendall M., Vugia D.J., Henao O.L., Mahon B.E. Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996–2010: review of surveillance data from 2 systems // *Clin. Infect. Dis.* – 2012. – Vol. 54, Suppl 5. – P. S391–S395. doi:10.1093/cid/cis243.
22. Nonaka L., Suzuki S. New Mg²⁺-dependent oxytetracycline resistance determinant *tet 34* in *Vibrio* isolates from marine fish intestinal contents // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2002. – Vol. 46. – No. 5. – P. 1550–1552.
23. Padovan A., Siboni N., Kaestli M., King W.L., Seymour J.R., Gibb K. Occurrence and dynamics of potentially pathogenic vibrios in the wet-dry tropics of northern Australia // *Mar. Environ. Res.* – 2021. – Vol. 169. – Art. 105405. doi: 10.1016/j.marenvres.2021.105405.
24. Parthasarathy S., Das S.C., Kumar A., Chowdhury G., Miyoshi S.I., Dutta S., Mukhopadhyay A.K. Molecular characterization and antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from Indian oyster and their probable implication in food chain // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2021. – Vol. 37. – Art. 145. doi: 10.1007/s11274-021-03113-3.
25. Petridou E., Filioussis G., Karavanis E., Kritas S.K. *Stenotrophomonas maltophilia* as a causal agent of pyogranulomatous hepatitis in a buffalo (*Bubalus bubalis*) // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2010. – Vol. 22. – No. 5. – P. 772–774.
26. Saima S., Fiaz M., Zafar R., Ahmed I., Arshad M. Dissemination of antibiotic resistance in the environment // *Antibiotics and antimicrobial resistance genes in the environment.* – 2020. – Vol. 1. – P. 99–116.
27. Seemann T. ABRicate: mass screening of contigs for antibiotic resistance genes [Электронный ресурс]. – URL: <https://github.com/tseemann/abricate> (date access: 16.10.2022).
28. Teo J.W., Tan T.M., Poh C.L. Genetic determinants of tetracycline resistance in *Vibrio harveyi* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2002. – Vol. 46. – No. 4. – P. 1038–1045.
29. Vasey J., Jones D., Deng C.H., Hedderley D., Martinez-Urtaza J., Powell A., Wang J., Wright J., Merien A.P., Fletcher G.C., Vidovic S. Comparative genomics uncovered differences between clinical and environmental populations of *Vibrio parahaemolyticus* in New Zealand // *Microb. Genom.* – 2023. – Vol. 9. – Art. 6:mgen001037. doi: 10.1099/mgen.0.001037.
30. Wang M., Guo Q., Xu X., Wang X., Ye X., Wu S., Hooper D.C., Wang M. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2009. – Vol. 53. – No. 5. – P. 1892–1897.
31. Woodford N., Carattoli A., Karisik E., Underwood A., Ellington M.J., Livermore D.M. Complete nucleotide sequences of plasmids ρ EK204, ρ EK499, and ρ EK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2009. – Vol. 53. – No. 10. – P. 4472–4482.
32. Yan J.J., Hsueh P.R., Lu, J.J., Chang F.Y., Ko W.C., Wu J.J. Characterization of acquired β -lactamases and their genetic support in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan: The prevalence of unusual integrons // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2006. – Vol. 58. – No. 3. – P. 530–536.
33. Zankari E., Hasman H., Cosentino S., Vestergaard M., Rasmussen S., Lund O., Aarestrup F.M., Larsen M.V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2012. – Vol. 67. – No. 11. – P. 2640–2644.

References

1. Beleneva IA. Vibrioflora gidrobiontov i vody zalivov Petra Velikogo (Yaponskoye more) i Nyachang (Yuzhno-kitayskoye more). *Biologiya morya* 2020; 46(5):338–348 (in Russian).
2. Davidovich NV, Kukalevskaya NN, Bashilova YeN, Bazhukova TA. Osnovnyye printsipy evolyutsii antibiotikorezistentnosti u bakteriy (obzor literatury). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2020; 65(6):387–393 (in Russian).
3. Kruglikov VD, Gayevskaya NYe, Monakhova YeV, Moskvitina EA, Agafonova VV, Savina IV, Podoyunitsyna OA, Selyanskaya NA, Vodop'yanov AS, Duvanov OV, Men'shikova YeA, Yezhova MI, Shipko YeS, Yevteyev AV, Kaz'mina VS, Bodraya PV, Sokirkina YeN. Analiz osobennostey epidemiologicheskoy situatsii po kholere v 2024 g. v mire, v Rossiyskoy Federatsii i prognoz yeye razvitiya na 2025 g. *Problemy osobopasnykh infektsiy* 2025; 1:35–47 (in Russian).
4. MUK 4.2.2495-09. Opredeleniye chuvstvitel'nosti vozбудiteley opasnykh bakterial'nykh infektsiy (chuma, sibirskaya

- yazva, kholera, tulyaremiya, brutselloz, sap, melioidoz) k antibakterial'nym preparatam. Metodicheskiye ukazaniya. Moscow: Federal'nyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2010: 59 (in Russian).
5. Rasporyazheniye Pravitel'stva Rossiyskoy Federatsii ot 25.09.2017 № 2045-r «Ob utverzhdenii Strategii preduprezhdeniya rasprostraneniya antimikrobnoy rezistentnosti v Rossiyskoy Federatsii na period do 2030 goda i plana meropriyatiy po yeye realizatsii s proyektom doklada Prezidentu Rossiyskoy Federatsii po dannomu voprosu». URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001201710030067?index=2> (date of access 03.04.2025) (in Russian).
 6. Rekomendatsii «Opredeleniye chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antimikrobnym preparatam» Versiya 2021–01. EUCAST. URL: <https://www.antibiotic.ru.>files/321/clrec-dsma.2021.pdf>. (date of access 03.04.2025) (in Russian).
 7. Rykovskaya OA. Molekulyarno-biologicheskaya kharakteristika i sovershenstvovaniye identifikatsii i differentsiatsii *Vibrio parahaemolyticus* i *Vibrio alginolyticus*: Dis... kand biol nauk. Rostov-na-Donu, 2016: 144 (in Russian).
 8. Smolikova LM, Lomov YuM, Khomenko TV, Mur-nachev GP, Kudryakova TA, Fetsaylova OP, Sanamyants EM, Makedonova LD, Kachkina GV, Golenishcheva EN. Galofil'nyye vibriony, vyzvavshiy vspyshku pishchevykh toksikoinfektsiy v g Vladivostoke. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, immunobiologii 2001; 6:3–7 (in Russian).
 9. Federal'nyy zakon ot 30.12.2020 № 492-FZ «O biologicheskoy bezopasnosti Rossiyskoy Federatsii». URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202012300021> (date of access 03.04.2025) (in Russian).
 10. Tsirkunova ZhF, Yemel'yanova AA, Gudkova YeI, Skorokhod GA, Butkevich VV, Slabko IN, Berdnik NN, Gavrilova IA. Vliyaniye subingibiruyushchikh kontsentratsiy biotsidov na formirovaniye adaptivnoy ustoychivosti klinicheskikh izolyatov *Klebsiella pneumoniae*. Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya 2022; 3:30–39 (in Russian).
 11. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Computat Biol 2012; 19(5):455–477.
 12. Berglund B. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. Infect Ecol Epidemiol 2015; 5:28564. doi: 10.3402/iee.v5.28564.
 13. Chiou J, Li R, Chen S. CARB-17 family of β -lactamases mediates intrinsic resistance to penicillins in *Vibrio parahaemolyticus*. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59(6):3593–3595.
 14. Chowdhury A, Ishibashi M, Thiem VD, Tuyet DT, Tung TV, Chien BT, Seidlein LvLv, Canh DG, Clemens J, Trach DD, Nishibuchi M. Emergence and serovar transition of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1999. Microbial Immunol 2004; 48(4):319–327.
 15. Elmahdi S, DaSilva LV, Parveen S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: A review. Food Microbiol 2016; 57:128–134.
 16. Han JE, Kim JH, Cheresca CH,jr, Shin SP, Jun JW, Chai JY, Han SY, Park SC. First description of the qnrS-like (qnrS5) gene and analysis of quinolone resistance-determining regions in motile *Aeromonas* spp. from diseased fish and water. Res Microbiol 2012; 163(1):73–79.
 17. Igbinsola EO, Beshiru A, Igbinsola IH, Ogofure AG, Uwhuba KE. Prevalence and characterization of food-borne *Vibrio parahaemolyticus* from African Salad in Southern Nigeria Front Microbiol 2021; 12:632266. doi: 10.3389/fmicb.2021.632266.
 18. Li BS, Li JH, Liang DM, He BX, Ke MZ, Liu Y, Long HP, Dong H. Epidemiological and etiological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* strains causing foodborne disease outbreaks in Guangdong Province from 2017 to 2020. Chinese J Preventive Med 2022; 56(4):443–447.
 19. Li P, Liu C, Li B, Ma Q. Structural analysis of the CARB β -lactamase from *Vibrio parahaemolyticus* facilitates application of the β -lactam/ β -lactamase inhibitor therapy. Biochimie 2020; 171–172:213–222.
 20. Martinez-Urtaza J, Trinanes J, Abanto M, Lozano-Leon A, Llovo-Taboada J, Garcia-Campello M, Pousa A, Powell A, Baker-Austin C, Gonzalez-Escalona N. Epidemic dynamics of *Vibrio parahaemolyticus* illness in a 174 hotspot of disease emergence, Galicia, Spain. Emerg Infect Dis 2018; 24(5):852–859.
 21. Newton A, Kendall M, Vugia DJ, Henao OL, Mahon BE. Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996–2010: review of surveillance data from 2 systems. Clin Infect Dis 2012; 54(Suppl 5):S391–S395. doi:10.1093/cid/cis243.
 22. Nonaka L, Suzuki S. New Mg²⁺-dependent oxytetracycline resistance determinant *tet 34* in *Vibrio* isolates from marine fish intestinal contents. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(5):1550–1552.
 23. Padovan A, Siboni N, Kaestli M, King WL, Seymour JR, Gibb K. Occurrence and dynamics of potentially pathogenic vibrios in the wet-dry tropics of northern Australia. Mar Environ Res 2021; 169:105405. doi: 10.1016/j.marenvres.2021.105405.
 24. Parthasarathy S, Das SC, Kumar A, Chowdhury G, Miyoshi SI, Dutta S, Mukhopadhyay AK. Molecular characterization and antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from Indian oyster and their probable implication in food chain. World J Microbiol Biotechnol 2021; 37:145. doi: 10.1007/s11274-021-03113-3.

25. Petridou E, Filioussis G, Karavanis E, Kritas SK. *Stenotrophomonas maltophilia* as a causal agent of pyogranulomatous hepatitis in a buffalo (*Bubalus bubalis*). J Vet Diagn Invest 2010; 22(5):772–774.
26. Saima S, Fiaz M, Zafar R, Ahmed I, Arshad M. Dissemination of antibiotic resistance in the environment. Antibiotics and antimicrobial resistance genes in the environment 2020; 1:99–116.
27. Seemann T. ABRicate: mass screening of contigs for antibiotic resistance genes. URL: <https://github.com/tseemann/abricate> (date access: 16.10.2022).
28. Teo JW, Tan TM, Poh CL. Genetic determinants of tetracycline resistance in *Vibrio harveyi*. Antimicrob. Agents Chemother 2002; 46(4):1038–1045.
29. Vasey J, Jones D, Deng CH, Hedderley D, Martinez-Urtaza J, Powell A, Wang J, Wright J, Merien AP, Fletcher GC, Vidovic S. Comparative genomics uncovered differences between clinical and environmental populations of *Vibrio parahaemolyticus* in New Zealand. Microb Genom 2023; 9:6:mgen001037. doi: 10.1099/mgen.0.001037.
30. Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, Hooper DC, Wang M. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. Antimicrob. Agents Chemother 2009; 53(5):1892–1897.
31. Woodford N, Carattoli A, Karisik E, Underwood A, Ellington MJ, Livermore DM. Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(10):4472–4482.
32. Yan JJ, Hsueh PR, Lu, JJ, Chang FY, Ko WC, Wu JJ. Characterization of acquired β -lactamases and their genetic support in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan: The prevalence of unusual integrons. J Antimicrob Chemother 2006; 58(3):530–536.
33. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. J Antimicrob Chemother 2012; 67(11):2640–2644.

MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR GENETIC ASPECTS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* STRAINS

M.M. SAGAKYANTS, O.A. PODOINITSYNA, V.V. AGAFONOVA, O.A. CYRULINA,
M.V. POLEEVA, V.V. LYCHMAN, A.YU. KARNAUKHOV

Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don

Vibrio parahaemolyticus is one of the main causes of acute intestinal disease, which occurs as a type of food poisoning associated with eating raw or insufficiently heat-treated seafood. Currently, *V. parahaemolyticus* is being recorded worldwide, isolated from humans and isolated from environmental objects, for which an increase in antibiotic resistance and the formation of multiple resistance are recorded. The purpose of this study is to evaluate the spectrum of antibiotic resistance/sensitivity and to search for markers (genes) of antibiotic resistance of *V. parahaemolyticus* strains. 108 collection strains of *V. parahaemolyticus* were studied. Sensitivity to antibacterial drugs was determined by the disco diffusion method. Genome-wide sequencing based on next generation sequencing technology was performed, the search for antibiotic resistance genes was carried out using the Abricate 1.0.1 program, Resfinder was used as a database. For all the studied *V. parahaemolyticus* strains, 85.7% of clinical strains and 62.7% of environmental strains were found to be resistant to one antibacterial drug; 14.3% of clinical strains and 33.9% of environmental strains were resistant to two antibacterial drugs. Several strains of *V. parahaemolyticus* from environmental objects (3.4%) showed resistance to three antibacterial drugs simultaneously. Resistance to more than three antibacterial drugs has not been revealed. It has been shown that strains from environmental objects demonstrate phenotypic resistance to two/three antibacterial drugs almost three times more often than *V. parahaemolyticus*, which have a clinical origin. Beta-lactamase class A genes were detected in 100% of the strains, which correlates with their resistance to ampicillin. All strains have the *tet34* and *tet35* genes, which cause resistance to tetracycline, but sensitivity to this antibacterial drug has been established for all studied strains. It can be assumed that the *tet34* and *tet35* genes in this case perform another function, probably related to the metabolic activity of *V. parahaemolyticus*.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, antibacterial drug, antibiotic resistance, genome-wide sequencing.

Address:

Sagakyants M.M.
researcher, Pathogenic Microorganism Collection Laboratory,
Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor
E-mail: margsak@rambler.ru

Для цитирования:

Сагакянц М.М., Подойницына О.А., Агафонова В.В., Цырулина О.А., Полеева М.В., Лычман В.А., Карнаухов А.Ю. Микробиологические и молекулярно-генетические аспекты антибиотикорезистентности штаммов *Vibrio parahaemolyticus*. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2026; 22(1):61–70.

For citation:

Sagakyants M.M., Podoinitsyna O.A., Agafonova V.V., Cyrulina O.A., Poleeva M.V., Lychman V.V., Karnaukhov A.Yu. Microbiological and molecular genetic aspects of antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* strains. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2026; 22(1): 61–70 (in Russian).

ИММОБИЛИЗАЦИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В ГИДРОГЕЛЕВЫЕ СФЕРОИДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОДХОДОВ МИКРОФЛЮИДИКИ

А.Л. СПИРИДОНОВА^{1,2*}, Д.С. ВЛАДИМИРОВ¹, И.А. ЧЕРЕНКОВ^{1,2}

¹ Удмуртский государственный университет, г. Ижевск

² ООО «Технологии микрофлюидной инкапсуляции», г. Ижевск

Цель работы — моделирование, изготовление и экспериментальная апробация микрофлюидного генератора гидрогелевых капель для иммобилизации клеток микроводорослей. Проведено цифровое моделирование микрофлюидного чипа для генерации эмульсий типа «вода-в-масле» с использованием уравнений Навье — Стокса и метода фазового поля при оптимизированных геометрических параметрах каналов. На основе модели изготовлены 3D-печатные чипы. Установлены параметры стабильной генерации: давление раствора альгината 70–100 кПа при давлении масла 50 кПа. Проведена иммобилизация клеток *Scenedesmus quadricauda* с равномерным распределением в объеме гидрогеля.

Ключевые слова: численное моделирование; микрофлюидные чипы; иммобилизация; микроводоросли; альгинат; 3D-печать.

Введение

Иммобилизованные микроводоросли находят широкое применение в биотехнологии [1, 5, 8, 23]. С практической точки зрения использование иммобилизованных микроорганизмов имеет ряд преимуществ — повышается устойчивость клеток к внешним факторам: колебаниям pH и ионной силы среды, влиянию токсинов, гидродинамическим воздействиям и т. д. [1, 5, 23, 2, 15, 18]. Отмечено повышение синтеза пигментов и жирных кислот иммобилизованными микроводорослями по сравнению со свободноплавающими [2]. Гидрогелевые конструкторы с иммобилизованными микроводорослями показали высокую эффективность при очистке сточных вод и переработке органических отходов, а также в технологиях получения биотоплива и ценных биоорганических соединений [1, 2, 5, 8, 11, 13, 15, 18, 21, 23, 24]. В ряде случаев критически важным является постоянство размеров частиц с иммобилизованными клетками, высокая суммарная поверхность и оптическая прозрачность [24, 16]. Эти задачи решает генерация гидрогелевых сфероидов с иммобилизованными микроводорослями с применением подходов микрофлюидики [9, 19]. Микро-

флюидные чипы для работы с микроводорослями обычно используются для сортировки клеток, их систематической идентификации и других исследовательских задач [9, 14, 19]. Широкое внедрение микрофлюидных чипов для решения биотехнологических задач сдерживалось их высокой стоимостью, трудоемкостью проектирования и изготовления. В настоящее время доступны программные средства и устройства для изготовления микрофлюидных чипов [12], что позволяет разрабатывать и использовать простые в изготовлении чипы для генерации гидрогелевых сфероидов, содержащих клетки микроводорослей.

Целью работы стало моделирование и изготовление микрофлюидного генератора гидрогелевых капель для иммобилизации клеток микроводорослей и его экспериментальная апробация.

Материалы и методы

Моделирование и изготовление прототипа микрофлюидного чипа

Все этапы моделирования микрофлюидного чипа осуществлялись при помощи программного пакета *COMSOL MultiPhysics* (академическая лицензия № 9602304).

Содержательная постановка задачи для построения модели микрофлюидного чипа включала компьютерное моделирование образования сфероидов альгината (дисперсной фазы) в потоке масла (непрерывной фазы) в микрофлюидном чипе с учетом следующих варьируемых входных данных:

© 2026 г. Спиридонова А.Л., Владимиров Д.С., Черенков И.А.

* **Автор для переписки:**

Спиридонова Антонина Леонидовна

старший лаборант кафедры физиологии, клеточной биологии и биотехнологии, ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск

E-mail: seiridonovatona@yandex.ru

1. геометрические параметры каналов микрофлюидного чипа;
2. физические свойства материалов (вязкость, плотность);
3. скорость потока жидкости в зависимости от входного материала.

С точки зрения физико-химической постановки задачи модель описывает гидродинамику взаимодействия двух несмешивающихся жидкостей в микроканалах. Построение производилось с помощью функции *Geometry Sketch*. Конфигурация основана на известной схеме чипа для генерации эмульсий типа «вода-в-масле» [3, 9, 26], при этом канал для масла (непрерывной фазы) выполнен в виде единого контура (рисунок 1) для упрощения подключения к контроллеру давления. Для оптимизации процесса построения геометрии использована функция симметрии (*Symmetry*). Осью симметрии (Ox) выбрана линия, проходящая вдоль направления основного потока через центр канала дисперсной фазы ($y=0$). Полная геометрическая модель чипа формируется путем применения операции двумерного зеркального отражения (*Mirror 2D*) к исходной половине модели. Все последующие расчеты гидродинамики и формирования капель выполняются для полученной полной модели.

Микрофлюидный чип имеет стандартную T-образную конфигурацию (канал дисперсной фазы входит перпендикулярно в основной канал с маслом) [3, 26]. Размер канала исследуемой жидкости (дисперсной фазы) диаметром 1 мм, масла (непрерывной фазы) диаметром 0,5 мм. Объединенный выходной канал после зоны формирования сфероидов имеет длину 35 мм. Общая длина чипа составляет 50 мм. Модель геометрии представляет собой систему взаимосвязанных микроканалов с учетом возможности изготовления методом 3D-печати.

Физико-математическая модель микрофлюидной системы базируется на свойствах используемых жидкостей, определяющих их гидродинамическое поведение. В качестве дисперсной фазы использовался раствор альгината натрия ($\rho=1050$ кг/м³, $\mu=0,25$ Па·с). Непрерывная фаза — вазелиновое масло ($\rho=890$ кг/м³, $\mu=0,05$ Па·с). Данные параметры использованы в уравнении Навье — Стокса для описания двухфазного течения, формирования сфероидов в T-образном соединении и стабильности эмульсии с учетом капиллярных сил.

Гидродинамическое поведение двухфазной системы в микрофлюидном чипе описывается уравнениями Навье — Стокса, представляющими собой систему частных дифференциальных уравнений, описывающих течение несжимаемых жидкостей с постоянной вязко-

стью [17, 22]. Уравнение сохранения импульса связывает ключевые физические параметры потока:

$$\rho \left(\frac{\partial u}{\partial t} + (u \times \nabla) u \right) = -\nabla p + \mu \nabla^2 u + F,$$

где u — вектор скорости жидкости (м/с), характеризующий перенос массы; p — давление (Па), создающее движущую силу потока; ρ — плотность (кг/м³), определяющая инерционные свойства; μ — динамическая вязкость (Па·с), описывающая сопротивление сдвигу; F — массовые силы (например, гравитация ρg). Физически левая часть уравнения отражает инерционные эффекты, правая — баланс сил давления, вязкого трения и внешних воздействий.

Уравнение неразрывности для несжимаемой жидкости:

$$\nabla \times u = 0,$$

где доминирующими являются эффекты давления и вязкости.

Силы поверхностного натяжения действуют вдоль поверхности жидкости, стремясь сократить ее площадь. Это заставляет систему минимизировать площадь контакта, формируя сферические капли. Коэффициент поверхностного натяжения (σ) задан автоматически при построении модели в *COMSOL* и составляет 73 мН/м.

Моделирование двухфазного течения реализовано методом фазового поля, который описывает эволюцию границы раздела с помощью непрерывного параметра порядка φ . В данной модели $\varphi = -1$ соответствует дисперсной фазе, $\varphi = 1$ соответствует маслу.

Динамика процесса описывается уравнением Кана-Хилларда:

$$\frac{\partial \varphi}{\partial t} + u \times \nabla \varphi = \nabla \times (\gamma \nabla \psi),$$

где φ — параметр порядка ($\varphi \in [-1, 1]$), ψ — химический потенциал, γ — кинетический коэффициент (подвижность).

При моделировании использовалась регулярная сетка с измельчением элементов вблизи угла.

Модели для изготовления чипов были спроектированы в программе КОМПАС 3D v23. Все варианты моделей были экспортированы в формат *STL* и напечатаны на FDM-принтере *Crealty Ender-3 V3 KE*. Для получения высококачественных отпечатков использовали следующие настройки печати: плотность заполнения 100%, высота слоя 0,1 мм, ширина слоя 0,4 мм, с включенной функцией сглаживания верхних поверхностей. Материал — полиэтилентерефталат-гликоль (PETG)

прозрачный. Микрофлюидные устройства, полученные при печати, использовали без дополнительной обработки.

Получение альгинатных сфероидов

Изготовленные чипы подключали к микрофлюидной установке, включающей компрессор *Elveflow PVS-P-02-230*, трехканальный контроллер микрожидкостного потока *Elveflow OB1-2220* с возможностью регулировки давления в каналах, цифровые датчики скорости потока для микрофлюидики *MFS-D-3*. Для подключения чипа использовали штекеры *Mini Luer (KFI-29)* и трубки *PTFE 1/32*» (0,76 мм внешний диаметр; 0,3 мм внутренний диаметр). Для сбора сфероидов использовали стакан объемом 50 мл с раствором CaCl_2 (1 М) при постоянном перемешивании (рисунок 2).

Для улучшения визуализации сфероидов в раствор альгината вводили краситель *Blue Dextran* (Sigma-Aldrich).

Иммобилизация клеток микроводорослей

Модельным объектом для иммобилизации были водоросли *Scenedesmus quadricauda*, которые культивировали на среде Прата по методике, приведенной в ГОСТ Р 54496-2011 (ИСО 8692:2004) в шейкер-инкубаторе *Environmental Shaker-Incubator ES-20* (BioSan) при температуре 22 °С и частоте перемешивания 150 об/мин. Клетки в фазе активного роста концентрировали центрифугированием (1500 об/мин, 5 мин.), используя центрифугу ЦЛН-16.

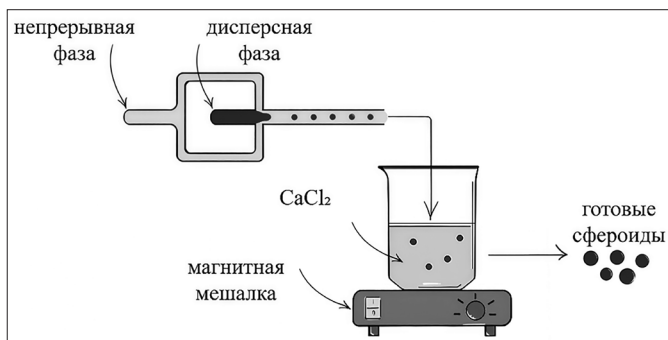


Рис. 1. Схема получения гидрогелевых сфероидов

Концентрат микроводорослей ресуспендировали в растворе альгината натрия (1 масс. %) и использовали для получения сфероидов с иммобилизованными клетками.

Контроль распределения размеров сфероидов проводился с использованием микроскопа «Микмед», оснащенного окулярной камерой *TopCam UA1200CA*, с последующей обработкой изображений в программе *TopLite*. Статистический анализ данных выполнялся в среде разработки *VS Code* с использованием языка

программирования *Python 3.13.1* и специализированных библиотек: *NumPy* для работы с массивами данных, *SciPy* для применения статистических методов и математических функций, а также *Matplotlib* для визуализации результатов.

Результаты и обсуждение

Теоретическая модель генерации сфероидов

Основным задаваемым параметром исследуемой модели стала скорость потока дисперсной фазы (водного раствора альгината натрия) $u=0,005$ м/с, масла $u=0,01$ м/с. Данные значения подбирались экспериментально до достижения стабильного образования сфероидов (рисунок 2).

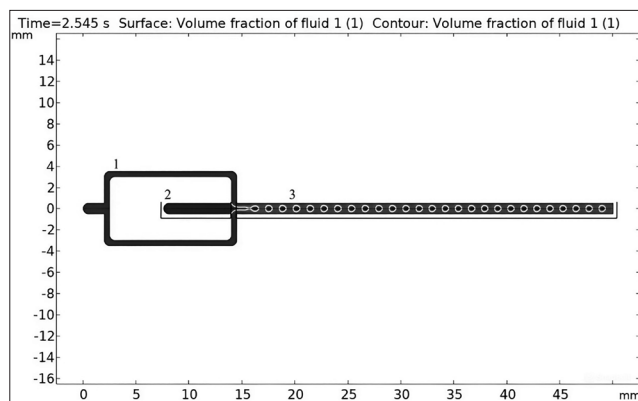


Рис. 2. Конфигурация микрофлюидного чипа для генерации эмульсий типа «водный раствор альгината натрия-в-масле», построенная в *COMSOL Multiphysics*. 1 – канал масляного контура (непрерывной фазы), 2 – канал подачи водного раствора альгината натрия (дисперсной фазы), 3 – выходной канал со сфероидами

Моделирование показало формирование капель дисперсной фазы (водный раствор с плотностью $\rho = 1050$ кг/м³ и динамической вязкостью $\mu = 0,001$ Па·с) в потоке непрерывной фазы (вазелиновое масло с $\rho = 890$ кг/м³ и $\mu = 0,25$ Па·с) в микрофлюидном чипе. Анализ распределения объемной доли жидкости при скоростях потоков 0,005 м/с для дисперсной фазы и 0,01 м/с для непрерывной фазы показал, что в поперечном сечении канала (локализация по Ox в диапазоне от 14 до 16 мм) наблюдается четкое разделение фаз с образованием устойчивых дисперсных капель. Моделирование подтвердило, что подобранные параметры потоков и свойства жидкостей гарантируют стабильное образование сфероидов, что соответствует требованиям для контролируемого синтеза альгинатных микросфер.

Анализ распределения давления в микрофлюидном чипе для создания эмульсий «водный раствор альгината натрия-в-масле» показал, что в момент времени 2,545 секунды фиксируется изменение давления от $0,05 \times 10^3$ до $5,73 \times 10^3$ Па. Наибольшие значения давления ($5,73 \times 10^3$ Па) наблюдались в зоне подачи масляной фазы. По мере движения потока вдоль канала по Ox давление постепенно снижалось до минимальных значений ($0,05 \times 10^3$ Па) в выходной области, что указывает на стабилизацию двухфазной системы. Заданные условия подходят для эффективного дробления водной фазы и формирования монодисперсных альгинатных капель. Полученные результаты подтверждают, что конструкция чипа обеспечивает оптимальные параметры для создания стабильных эмульсий из раствора альгината натрия.

Построение и печать чипа для генерации сфероидов

На основе численных экспериментов была построена 3D-модель микрофлюидного чипа для печати. Было подготовлено несколько версий с разным диаметром центрального канала (0,25; 0,5; 1 и 2 мм). Каналы для масла (контур непрерывной фазы) во всех версиях чипов имели диаметры, уменьшенные вдвое относительно соответствующего центрального канала (дисперсной фазы), а именно: 0,125; 0,25; 0,5 и 1 мм соответственно, чтобы обеспечить соотношение диаметров масляного и водного (альгинатного) каналов как 1:2.

После печати были получены готовые к использованию микрофлюидные устройства. Оптимальным вариантом стал чип с каналом дисперсной фазы 1 мм и каналом непрерывной фазы 0,5 мм (рисунок 3), дальнейшие результаты были получены с использованием данной конфигурации. Печатные чипы эквивалентны теоретическим, созданным в *COMSOL Multiphysics*.

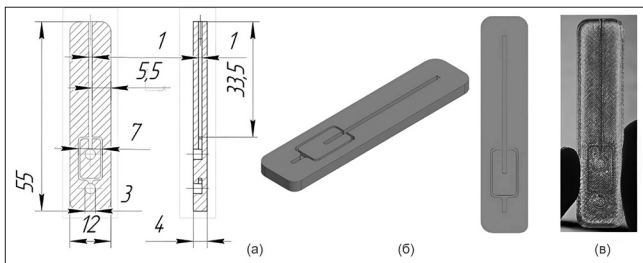


Рис. 3. Чертеж микрофлюидного чипа (размеры приведены в миллиметрах) (а), 3D-модель для печати (б) и готовый микрофлюидный чип (в)

Для оптимизации сбора сфероидов в микрофлюидном чипе использовали систему с регулируемым канальным удлинением, включающую политетрафторэ-

тиленовую трубку (внутренний диаметр 0,3 мм, внешний диаметр 0,76 мм). Трубку размещали таким образом, чтобы ее выходной конец находился в контакте с поверхностью желирующего агента (раствор CaCl_2), но не погружался в него полностью. Такая конфигурация позволяла несформированным сфероидам поступать на слой вазелинового масла, что обеспечивало образование структур сферической формы. Использование трубки предотвращает накопление и слияние сфероидов в основании чипа, а также образование дефектов («хвостиков», деформации сфероидов и др.). После формирования в масляном слое сфероиды опускались в раствор CaCl_2 для полимеризации.

В ходе работы была отмечена зависимость расстояния между сфероидами от давления альгината при постоянном давлении масла 50 кПа. Диапазон регулируемого давления альгината составляет от 50 до 130 кПа. При давлении альгината в 50 кПа образуются кластеры по 6–7 сфероидов, что свидетельствует о недостаточной подаче давления. При этом генерация стабильна. При давлении в 130 кПа образуются цилиндры, что указывает на избыточную подачу давления. Оптимальным оказался диапазон давления от 60 до 120 кПа. Однако для обеспечения стабильного результата и снижения риска ошибок при генерации рекомендуется рабочий диапазон от 70 до 100 кПа.

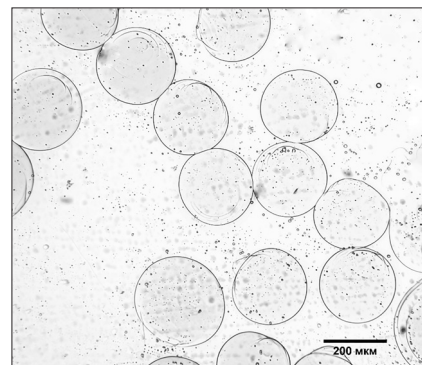


Рис. 4. Сфероиды «альгинат натрия-голубой декстран»

На полученных образцах (рисунок 4) проведен анализ размерного ряда сфероидов с течением времени. Измерения образцов выполнялись с помощью программы *TopoLite* на 1-й, 2-й и 3-й день хранения в растворе хлорида кальция. Статистическая обработка велась на ежедневной выборке из 200 измерений. Для сравнения процентного соотношения размерного ряда были построены гистограммы (рисунок 5), которые далее были переведены в кривые гауссовского распределения для визуализации изменения размерных классов. При

группировке значений в выводе использовался принцип диапазонов — например, к размеру 185 мкм относились сфероиды с размерами от 180 мкм до 190 мкм (исключая верхнюю границу).

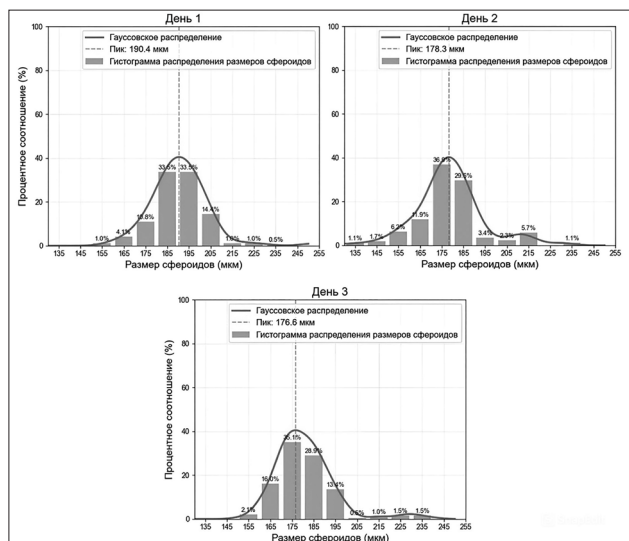


Рис. 5. Изменение процентного соотношения размеров сфероидов «альгинат натрия-голубой декстран» с течением времени

Распределение частиц по размерам показало, что в первый день преобладали сфероиды размером 185 мкм (33,5%), 195 мкм (33,5%) и 205 мкм (14,4%). На второй день наблюдалось заметное уменьшение размеров, при этом наибольший процент составляли сфероиды размером 165 мкм (11,9%), 175 мкм (36,9%) и 185 мкм (29,5%). К третьему дню распределение сместилось в сторону размеров 165 мкм (16,0%), 175 мкм (35,1%) и 185 мкм (28,9%). Уменьшение средних размеров подтверждается сдвигом пика распределения: 190,4 мкм (день 1), 178,3 мкм (день 2) и 176,6 мкм (день 3).

Наблюдаемое уменьшение размеров сфероидов объясняется продолжающейся сшивкой и частичной дегидратацией сфероидов в солевом растворе. Альгинат натрия (1 масс. %) был приготовлен на дистиллированной воде, а сшивающий агент представляет собой концентрированный раствор CaCl_2 (1 М), и возникает градиент концентрации между внутренней средой сфероидов и окружающим раствором. Это может приводить к перемещению воды из сфероидов в окружающий гипертонический раствор. Одновременно с этим ионы кальция продолжают диффундировать вглубь сфероидов, усиливая сшивку полимерных цепей альгината, что вызывает уплотнение структуры и сокращение объема. Явление сжатия сфероидов следует учитывать при получении гидрогелевых конструкций.

Генерация сфероидов с иммобилизованными водорослями

Scenedesmus quadricauda — представитель зеленых водорослей. Типичным для *S. quadricauda* является формирование ценобиев, состоящих из 4 — 16 продолговатых клеток, соединенных боковыми стенками. Клетки обладают гладкой поверхностью, иногда с выростами, при этом крайние клетки ценобия нередко имеют шиповидные образования (рисунок 6а). Это один из модельных одноклеточных организмов, что объясняется повсеместным его распространением и простотой культивирования. Благодаря выраженным реакциям на экотоксиканты *S. quadricauda* включен в ГОСТ Р 54496-2011(ИСО 8692:2004) «Вода. Определение токсичности с использованием зеленых пресноводных одноклеточных водорослей» как тест-объект [4]. Представители рода *Scenedesmus* используются для очистки сточных вод [1, 6, 13, 15, 18, 21, 23, 25], для биотехнологического получения пигментов и биотоплива [10, 11, 20, 21]. Поэтому совершенствование способов иммобилизации *Scenedesmus* представляет собой актуальную задачу.

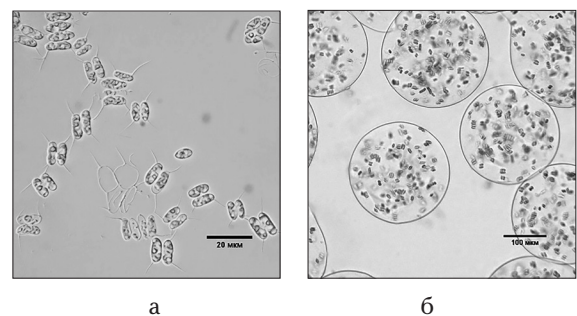


Рис. 6. Клетки *Scenedesmus quadricauda* в культуральной среде (а). Сфероиды с иммобилизованными водорослями (б)

В наших экспериментах взвесь водорослей в культуральной среде Прата хорошо смешивалась с раствором альгината, не вызывая выраженного гелеобразования. При перемешивании легко получить равномерное распределение клеток в объеме раствора.

Сфероиды с включенными водорослями получали при тех же условиях, что и бесклеточные сфероиды. Микроскопический анализ показал воспроизводимую форму сфероидов и равномерное распределение клеток в их объеме (рисунок 6б). Доля клеток *Scenedesmus quadricauda* в сфероидах составляла примерно 4,4% от общего объема, что было рассчитано исходя из среднего размера сфероидов в первый день эксперимента и количества иммобилизованных клеток.

Производительность установки при оптимальном давлении составила примерно 10 мкл сфероидов в минуту.

Полученные сфероиды оценивали по распределению размерных классов. Это одна из ключевых характеристик установки. Был произведен анализ размерного ряда сфероидов, содержащих микроводоросли, с течением времени; измерения производились на 1-й, 2-й и 3-й день (рисунок 7).

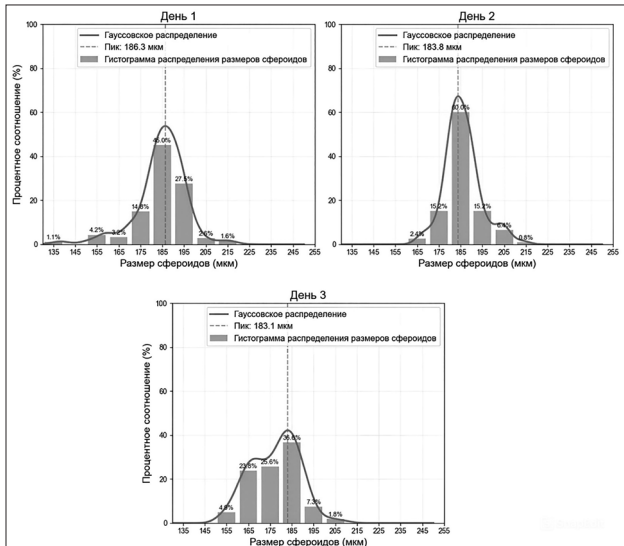


Рис. 7. Изменение процентного соотношения размеров альгинатных сфероидов с иммобилизованными водорослями с течением времени

Непосредственно после получения отмечено преобладание трех размерных классов частиц: 175 мкм (14,8%), 185 мкм (47,0%) и 195 мкм (27,5%). На второй день наблюдалось уменьшение средних размеров сфероидов с распределением по классам в следующем соотношении: 175 мкм (15,2%), 185 мкм (60,0%) и 195 мкм (15,2%). К третьему дню распределение сместилось в сторону размеров 165 мкм (23,8%), 175 мкм (25,6%) и 185 мкм (36,6%). Уменьшение средних размеров подтверждается сдвигом пика распределения на второй день хранения с последующей стабилизацией среднего: 186,3 мкм (день 1), 183,8 мкм (день 2) и 183,1 мкм (день 3). Изменения были менее выраженными, чем в случае бесклеточных сфероидов, но общая тенденция к уменьшению размеров сохранялась, данный вывод подтверждает график гауссовского распределения.

Менее выраженное уменьшение размеров сфероидов с водорослями (1,7% за 3 дня против 7,2% для бесклеточных аналогов) может объясняться двумя факторами. Во-первых, *Scenedesmus* обладают активными осморегуляторными механизмами, включающими транспорт ионов и синтез осмолитов, что позволяет им компенсировать градиент концентрации между гидрогелем и гипертоническим раствором CaCl_2 . Это согласуется

с данными [24], где инкапсулированные водоросли демонстрировали устойчивость к осмотическому стрессу в альгинатных гидрогелях. Кроме того, клетки водорослей, равномерно распределенные в объеме гидрогеля, создают дополнительную структурную поддержку, ограничивая сжатие полимерной сети при продолжающейся сшивке альгината ионами Ca^{2+} . *Benncasef* и соавторы объясняют снижение скорости и степени усадки гидрогелей при включении биологических объектов увеличением локальной жесткости матрицы [7].

Заключение

В ходе работы смоделирована и изготовлена простая и легко воспроизводимая микрофлюидная система на основе 3D-печатного чипа (*FDM, PETG*) с оптимальной геометрией каналов (дисперсная фаза: 1 мм, непрерывная фаза: 0,5 мм, соотношение 1:2), обеспечивающая стабильное формирование монодисперсных альгинатных сфероидов типа «вода-в-масле» и «альгинат-в-масле».

Оптимальный диапазон подачи давления альгината натрия от 70 до 100 кПа при постоянной подаче давления масла в 50 кПа, что обеспечивает стабильное получение сфероидов. Использование *PTFE*-трубки предотвращает дефекты и слияние частиц.

Большая часть сфероидов, полученных с помощью чипа, находилась в диапазоне от 180-200 мкм. Количественно оценено уменьшение сфероидов в течение 3-х дней: средний размер сфероидов с голубым декстраном с 190,4 мкм (1-й день) до 176,6 мкм (3-й день) — уменьшение на 7,2%, а с иммобилизованными водорослями в 1-й день средний размер составил 186,3 мкм, уменьшился до 183,1 мкм в третий день (на 1,7%).

Чип и реализуемая с его помощью технология генерации альгинатных сфероидов применимы для иммобилизации в альгинатные гели клеток микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* с равномерным распределением клеток в объеме гидрогеля.

Разработанная микрофлюидная система, обеспечивающая воспроизводимость и контроль размеров сфероидов, является инструментом для создания стандартизированных биоматериалов. Ее применение с использованием доступных технологий (3D-печать) открывает перспективы для создания биореакторов, систем доставки клеток и биосенсоров.

Благодарности. Авторы выражают благодарность ООО «ГенезисБио» и Центру аддитивных

технологий открытого доступа УдГУ за помощь в организации и проведении исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело дополнительной спонсорской поддержки

Литература

1. Васильева С.Г., Лобакова Е.С., Лукьянов А.А., Соловченко А.Е. Применение иммобилизованных водорослей в биотехнологии // Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология. – 2016. – № 3. – С. 65–72.
2. Васильева С.Г., Семёнова Л.Р., Селях И.О., Чивкунова О.Б., Щербаков П.Н., Баулина О.И., Горелова О.А., Лобакова Е.С. Иммобилизация смешанной культуры оксигенных фототрофных микроорганизмов на хитозановом сорбенте для биоизъятия биогенных элементов из сточных вод // Прикладная биохимия и микробиология. – 2022. – Т. 58. – № 1. – С. 66–73.
3. Кухтевич И.В., Посмитная Я.С., Белоусов К.И., Букатин А.С., Евстапов А.А. Принципы, технологии и устройства «капельной» микрофлюидики. Ч. 1 // Научное приборостроение. – 2015. – Т. 25. – № 3. – С. 65–85.
4. Польнов В.А., Максимова Е.Н., Богданов А.В., Цырендылыкова Л.Б. Оценка чувствительности стандартизованных альгобиотестов на основе зелёных водорослей к действию «модельного» токсиканта // Вода химия и экология. – 2024. – № 4. – С. 70–79.
5. de-Bashan L.E., Bashan Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects // Bioresource Technol. – 2010. – Vol. 101. – No. 6. – P. 1611–1627.
6. Bayramoğlu G., Yakup Arica M. Construction a hybrid biosorbent using *Scenedesmus quadricauda* and Ca-alginate for biosorption of Cu(II), Zn(II) and Ni(II): Kinetics and equilibrium studies // Bioresource Technol. – 2009. – Vol. 100. – No. 1. – P. 186–193.
7. Bennacef C., Desobry S., Jasniewski J., Leclerc S., Probst L., Desobry-Banon S. Influence of alginate properties and calcium chloride concentration on alginate bead reticulation and size: A phenomenological approach // Polymers (Basel). – 2023. – Vol. 15. – No. 20. – Art. 4163. doi: 10.3390/polym15204163.
8. Cortez S., Nicolau A., Flickinger M.C., Mota M.U. Bio-coatings: A new challenge for environmental biotechnology // Biochem. Eng. J. – 2017. – Vol. 121. – P. 25–37.
9. Damiani S. In situ microfluidic preparation and solidification of alginate microgels // Macromol. Res. – 2020. – Vol. 28. – No. 11. – P. 1046–1053.
10. Jeong Y.T., Lee B., Chang Y.K. Light stress after heterotrophic cultivation enhances lutein and biofuel production from a novel algal strain *Scenedesmus obliquus* ABC-009 // J. Microbiol. and Biotechnol. – 2022. – Vol. 32. – No. 3. – P. 378–386.
11. Joshi J.S., Fladung L., Kruse O., Patel A. Novel co-cultivation bioprocess with immobilized *Paenibacillus polymyxa* and *Scenedesmus obliquus* for lipid and butanediol production // Microorganisms. – 2025. – Vol. 13. – No. 3. – Art. 606. doi: 10.3390/microorganisms13030606.
12. Kara A., Vassiliadou A., Ongoren B., Keeble W., Hing R., Lalatsa A., Serrano D.R. Engineering 3^d printed microfluidic chips for the fabrication of nanomedicines // Pharmaceutics. – 2021. – Vol. 13. – No. 12. – Art. 2134. doi: 10.3390/pharmaceutics13122134.
13. Kariyawasam T., Petkovich M., Vriens B. Diclofenac Degradation by immobilized *Chlamydomonas reinhardtii* and *Scenedesmus obliquus* // MicrobiologyOpen. – 2024. – Vol. 13. – No. 6. – e70013. doi: 10.1002/mbo3.70013.
14. Kim H.S., Devarenne T.P., Han A. Microfluidic systems for microalgal biotechnology: A review // Algal Res. – 2018. – Vol. 30. – No. 7. – P. 149–161.
15. Lebeau T., Robert J.M. Biotechnology of immobilized microalgae: A culture technique for the future? // Algal Cult., Analog. Blooms and Appl. – 2006. – Vol. 2. – No. 1. – P. 801–837.
16. Lee H., Jeong D., Im S., Jang A. Optimization of alginate bead size immobilized with *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii* for nutrient removal // Bioresource technology. – 2020. – Vol. 302. – No. 11. – Art. 122891. doi: 10.1016/j.biortech.2020.122891.
17. Ley M.W.H., Bruus H. Continuum modeling of hydrodynamic particle-particle interactions in microfluidic high-concentration suspensions // Lab. Chip. Royal Soc. Chem. – 2016. – Vol. 16. – No. 7. – P. 1178–1188.
18. Li Y., Wu X., Liu Y., Taidi B. Immobilized microalgae: principles, processes and its applications in wastewater treatment // World J. Microbiol. and Biotechnol. – 2024. – Vol. 40. – No. 5. – Art. 150. doi: 10.1007/s11274-024-03930-2.
19. Ozdalgic B., Ustun M., Dabbagh S.R., Haznedaroglu B.Z., Kiraz A., Tasoglu S. Microfluidics for microalgal biotechnology // Biotechnol. and Bioeng. – 2021. – Vol. 118. – No. 4. – P. 1545–1563.
20. Rajput A., Singh D.P., Khattar J.S., Swatch G.K., Singh Y. Evaluation of growth and carotenoid production by a green microalga *Scenedesmus quadricauda* PUMCC 4.1.40. under optimized culture conditions // J. Basic Microbiol. – 2022. – Vol. 62. – No. 9. – P. 1156–1166.
21. Ruiz-Marin A., Canedo-López Y., Chávez-Fuentes P. Biohydrogen production by *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* immobilized cultivated in artificial wastewater under different light quality // AMB Express. – 2020. – Vol. 10. – No. 1. – Art. 191. doi: 10.1186/s13568-020-01129-w.
22. Sekhwama M., Mpofo K., Sivarasu S., Mthunzi-Kufa P. Applications of microfluidics in biosensing // Discover Appl.

- Sci. — 2024. — Vol. 6. — Art. 303. doi:10.1007/s42452-024-05981-4.
23. Tong C.Y., Derek C.J.C. Bio-coatings as immobilized microalgae cultivation enhancement: A review // Sci. Total Environ. — 2023. — Vol. 887. — No. 5. — Art. 163857. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.163857.
 24. Tran D.T., Galogahi F.M., Nguyen N.-K., Roshan U., Yadav A.S., Sreejith K.R., Nguyen N.-T. Microfluidic generation of calcium alginate hydrogel beads using external gelation for microalgae cultivation // ChemNanoMat. — 2025. — Vol. 11. — No. 3. — P. e202400549.
 25. Yoon S.-W., Noh J.-H., Park J.-W., Kim S.-Y., Lee Y., Choi B.-G., Maeng S.-K. Effects of N-acyl homoserine lactone on immobilized *Scenedesmus quadricauda* bead using Ca-alginate for wastewater treatment // J. Water Process Eng. — 2022. — Vol. 50. — P. 103333.
 26. Zarin T., Aghajanzadeh M., Riazi M., Ghaedi M., Motealeh M. Experimental and numerical study of the water-in-oil emulsions in porous media // Capillarity. — 2024. — Vol. 13. — No. 1. — P. 10–23.
- ## References
1. Vasil'yeva SG, Lobakova YeS, Luk'yanov AA, Solovchenko AYe. Primeneniye immobilizovannykh vodorosley v biotekhnologii. Vestnik Moskovskogo universiteta. Ser 16. Biologiya 2016; 3:65–72 (in Russian).
 2. Vasil'yeva SG, Semonova LR, Selyakh IO, Chivkunova OB, Shcherbakov PN, Baulina OI, Gorelova OA, Lobakova YeS. Immobilizatsiya smeshannoy kul'tury oksigennykh fototrofnyykh mikroorganizmov na khitozanovom sorbente dlya bioiz'yatiya biogennykh elementov iz stochnykh vod. Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya 2022; 58(1):66–73 (in Russian).
 3. Kukhtevich IV, Posmitnaya YAS, Belousov KI, Bukatin AS, Yevstrapov AA. Printsipy, tekhnologii i ustroystva «kapel'noy» mikroflyuidiki. Ch 1. Nauchnoye priborostroyeniye 2015; 25(3):65–85 (in Russian).
 4. Polynov VA, Maksimova YeN, Bogdanov AV, Tsyrendylykova LB. Otsenka chuvstvitel'nosti standartizirovannykh al'gobiotestov na osnove zelonykh vodorosley k deystviyu «model'nogo» toksikanta. Voda khimiya i ekologiya 2024; 4:70–79 (in Russian).
 5. de-Bashan LE, Bashan Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. Bioresource Technol 2010; 101. 6:1611–1627.
 6. Bayramoğlu G, Yakup Arica M. Construction a hybrid biosorbent using *Scenedesmus quadricauda* and Ca-alginate for biosorption of Cu(II), Zn(II) and Ni(II): Kinetics and equilibrium studies. Bioresource Technol 2009; 100(1):186–193.
 7. Bennacef C, Desobry S, Jasniewski J, Leclerc S, Probst L, Desobry-Banon S. Influence of alginate properties and calcium chloride concentration on alginate bead reticulation and size: A phenomenological approach. Polymers (Basel) 2023; 15(20):4163. doi: 10.3390/polym15204163.
 8. Cortez S, Nicolau A, Flickinger MC, Mota MU. Biocoatings: A new challenge for environmental biotechnology. Biochem. Eng J 2017; 121:25–37.
 9. Damiani S. In situ microfluidic preparation and solidification of alginate microgels. Macromol Res 2020; 28(11):1046–1053.
 10. Jeong YT, Lee B, Chang YK. Light stress after heterotrophic cultivation enhances lutein and biofuel production from a novel algal strain *Scenedesmus obliquus* ABC-009. J. Microbiol. and Biotechnol 2022; 32(3):378–386.
 11. Joshi JS, Fladung L, Kruse O, Patel A. Novel co-cultivation bioprocess with immobilized *Paenibacillus polymyxa* and *Scenedesmus obliquus* for lipid and butanediol production. Microorganisms 2025; 13(3):606. doi: 10.3390/microorganisms13030606.
 12. Kara A, Vassiliadou A, Ongoren B, Keeble W, Hing R, Lalatsa A, Serrano DR. Engineering 3^d printed microfluidic chips for the fabrication of nanomedicines. Pharmaceutics 2021; 13(12):2134. doi: 10.3390/pharmaceutics13122134.
 13. Kariyawasam T, Petkovich M, Vriens B. Diclofenac Degradation by immobilized *Chlamydomonas reinhardtii* and *Scenedesmus obliquus*. MicrobiologyOpen 2024; 13(6):e70013. doi: 10.1002/mbo3.70013.
 14. Kim HS, Devarenne TP, Han A. Microfluidic systems for microalgal biotechnology: A review. Algal Res 2018; 30(7):149–161.
 15. Lebeau T, Robert JM. Biotechnology of immobilized microalgae: A culture technique for the future? Algal Cult, Analog Blooms and Appl 2006; 2(1):801–837.
 16. Lee H, Jeong D, Im S, Jang A. Optimization of alginate bead size immobilized with *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii* for nutrient removal. Bioresource technology 2020; 302(11):122891. doi: 10.1016/j.biortech.2020.122891.
 17. Ley MWH, Bruus H. Continuum modeling of hydrodynamic particle-particle interactions in microfluidic high-concentration suspensions. Lab Chip Royal Soc Chem 2016; 16(7):1178–1188.
 18. Li Y, Wu X, Liu Y, Taidi B. Immobilized microalgae: principles, processes and its applications in wastewater treatment. World J Microbiol and Biotechnol 2024; 40(5):150. doi: 10.1007/s11274-024-03930-2.
 19. Ozdalgic B, Ustun M, Dabbagh SR, Haznedaroglu BZ, Kiraz A, Tasoglu S. Microfluidics for microalgal biotechnology. Biotechnol and Bioeng 2021; 118(4):1545–1563.
 20. Rajput A, Singh DP, Khattar JS, Swatch GK, Singh Y. Evaluation of growth and carotenoid production by a green microalga *Scenedesmus quadricauda* PUMCC 4.1.40. under optimized culture conditions. J Basic Microbiol 2022; 62(9):1156–1166.
 21. Ruiz-Marin A, Canedo-López Y, Chávez-Fuentes P. Biohydrogen production by *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* immobilized cultivated in artificial wastewater under different light quality. AMB Express 2020; 10(1):191. doi: 10.1186/s13568-020-01129-w.
 22. Sekhwama M, Mpopo K, Sivarasu S, Mthunzi-Kufa P. Applications of microfluidics in biosensing. Discover Appl Sci 2024; 6:303. doi:10.1007/s42452-024-05981-4.

23. Tong CY, Derek CJC. Bio-coatings as immobilized microalgae cultivation enhancement: A review. *Sci Total Environ* 2023; 887(5):163857. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.163857.
24. Tran DT, Galogahi FM, Nguyen N-K, Roshan U, Yadav AS, Sreejith KR, Nguyen N-T. Microfluidic generation of calcium alginate hydrogel beads using external gelation for microalgae cultivation. *ChemNanoMat* 2025; 11(3):e202400549.
25. Yoon S-W, Noh J-H, Park J-W, Kim S-Y, Lee Y, Choi B-G, Maeng S-K. Effects of N-acyl homoserine lactone on immobilized *Scenedesmus quadricauda* bead using Ca-alginate for wastewater treatment. *J Water Process Eng* 2022; 50:103333.
26. Zarin T, Aghajanzadeh M, Riazi M, Ghaedi M, Motealeh M. Experimental and numerical study of the water-in-oil emulsions in porous media. *Capillarity* 2024; 13(1):10–23.

IMMOBILISATION OF MICROALGAE IN HYDROGEL SPHEROIDS USING MICROFLUIDIC TECHNIQUES

A.L. SPIRIDONOVA^{1,2}, D.S. VLADIMIROV¹, I.A. CHERENKOV^{1,2}

¹Udmurt State University, Izhevsk

²Microfluidic Encapsulation Technologies LLC, Izhevsk

The aim of this work was to model, fabricate, and experimentally test a microfluidic hydrogel droplet generator for the immobilisation of microalgae cells. Digital modelling of the microfluidic chip for generating water-in-oil emulsions was performed using the Navier-Stokes equations and the phase-field method with optimized channel geometry parameters. 3D-printed chips were fabricated based on the model. The parameters for stable droplet generation were established: an alginate solution pressure of 70–100 kPa and an oil pressure of 50 kPa. Cells of *Scenedesmus quadricauda* were immobilized with a uniform distribution throughout the hydrogel volume.

Keywords: numerical modeling; microfluidic chips; immobilization; microalgae; alginate; 3D printing.

Address:

Spiridonova A.L.
senior laboratory assistant, Department of Physiology,
Cell Biology, and Biotechnology, Udmurt State University,
Izhevsk
E-mail: seiridonovatona@yandex.ru

Для цитирования:

Спиридонова А.Л., Владимиров Д.С., Черенков И.А. Иммунизация микроводорослей в гидрогелевые сфериды с использованием подходов микрофлюидики. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2026; 22(1):71–79.

For citation:

Spiridonova A.L., Vladimirov D.S., Cherenkov I.A. Immobilisation of microalgae in hydrogel spheroids using microfluidic techniques. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2026; 22(1): 71–79 (in Russian).

РАЗРАБОТКА ЭТАПОВ ПОЛУЧЕНИЯ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ ВКЛЮЧЕНИЯ В СОСТАВ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА

А.В. ТЮРИНА*, Н.Е. ГАЕВСКАЯ, М.П. ПОГОЖОВА, В.В. ЕВДОКИМОВА,
О.А. ЯКУШЕВА, Ю.В. СИЗОВА, А.О. АНОПРИЕНКО, О.А. БОГДАН

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Холера остается глобальной угрозой здравоохранения, особенно в регионах с неудовлетворительными санитарными условиями. Рост антибиотикорезистентности *Vibrio cholerae* требует разработки альтернативных методов лечения и профилактики, среди которых перспективным направлением является применение бактериофагов. Целью работы являлась разработка методического подхода для получения экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов. В данной работе были исследованы три вирулентных холерных бактериофага (Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1), обладающих высокой литической активностью и специфичностью к *V. cholerae* серогрупп О1 и О139. Показано, что фаги сохраняют активность при хранении (4–8 °С, 12 месяцев), устойчивы к хлороформу, но термолabileны (инактивация при 65 °С). Оптимизированная методика культивирования в физиологическом растворе позволила увеличить титр фаговых частиц до 10⁹ БОЕ/мл, а многоступенчатая очистка (фильтрация, хроматография) обеспечила отсутствие токсинов в фаголизатах. Контроль отсутствия липополисахарида (ЛПС) подтверждали методом ИФА. Разработанный методический подход позволил достичь двух ключевых результатов: увеличить выход фаговых частиц (на порядок) и обеспечить их очистку от бактериальных эндотоксинов. Итогом проведенных исследований является создание научно-методической базы для дальнейшего изучения безопасности и эффективности на животных моделях перспективных холерных бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1, в том числе и в составе экспериментальной смеси. Полученные результаты открывают новые возможности для разработки фаговых препаратов не только против холеры, но и других особо опасных инфекций.

Ключевые слова: холерные бактериофаги; литическая активность; очистка фаголизатов; профилактика холеры.

Введение

В настоящее время холера остается глобальной проблемой здравоохранения, сохраняя свою эпидемиологическую значимость для многих стран мира, особенно в регионах с неудовлетворительными санитарно-гигиеническими условиями [6, 9]. Особую тревогу вызывает растущая распространенность антибиотикорезистентных штаммов *Vibrio cholerae*, что существенно осложняет традиционные подходы к терапии этого заболевания [13, 15]. В связи с этим разработка альтернативных методов лечения и профилактики холеры приобретает особую актуальность. Одним из наиболее перспективных на-

правлений представляется использование бактериофагов — вирусов, избирательно поражающих бактериальные клетки. Их применение может стать эффективным инструментом как для терапии уже развившейся инфекции, так и для профилактики распространения заболевания, что требует интенсификации исследований по созданию высокоспецифичных и действенных препаратов на основе бактериофагов [16].

Несмотря на успешное применение бактериофагов для терапии и профилактики различных кишечных инфекций [3, 5], следует констатировать отсутствие коммерчески доступных фаговых препаратов против холеры [4]. Это особенно тревожно в контексте современной эпидемиологической ситуации. Данные обстоятельства делают особенно актуальной разработку специализированных фаговых препаратов против холеры и создание инновационных методических подходов к их производству.

Разработка эффективных бактериофаговых препаратов против холеры представляет собой сложную технологическую задачу, обусловленную особой патогенностью *Vibrio cholerae*. Ключевыми производственными требованиями

© 2026 г. Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Погожова М.П., Евдокимова В.В., Якушева О.А., Сизова Ю.В., Аноприенко А.О., Богдан О.А.

* Автор для переписки:

Тюрина Анна Владимировна
научный сотрудник, ио зав. лабораторией бактериофагов отдела
диагностических препаратов. ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора
E-mail: turina_av@antiplague.ru

являются: (1) соблюдение строгих норм биобезопасности; (2) определение биологических и генетических характеристик маточных бактериофагов; (3) достижение высоких титров фаговых частиц за счет тщательного подбора штаммов-продуцентов и оптимизации условий культивирования; (4) обеспечение исключительной степени очистки от бактериальных токсинов и компонентов питательной среды; (5) многоступенчатый контроль качества и стерильности [5, 11].

Производственный цикл требует одновременного обеспечения: максимального накопления биомассы бактерий-хозяев на этапе предкультивирования, высокой продуктивности фагового лизиса и максимального удаления токсичных метаболитов. Каждый этап — от подбора штаммов до финальной очистки — требует тщательной оптимизации. Только комплексный подход позволяет создавать эффективные и безопасные препараты, соответствующие как терапевтическим, так и профилактическим требованиям [10, 14].

Цель работы заключалась в разработке методического подхода для получения экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов.

Материалы и методы

В работе использовали холерные бактериофаги из коллекции-депозитария лаборатории бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. При отборе бактериофагов ФБ1, Rostov-M3 и Rostov-13 учитывался ряд ключевых показателей: молекулярно-генетические исследования, которые показали, что данные бактериофаги относятся к ДНК-содержащим хвостатым фагам, являются вирулентными (литическими), не содержат генов интегразы, антибиотикорезистентности и токсинов, что позволяет рассматривать их в качестве компонентов профилактических препаратов против холеры [8].

Работу с маточными холерными бактериофагами проводили по общепринятой методике [1] и нормативным документам [7]. Метод агаровых слоев (Грация) был выполнен в соответствии с методическими рекомендациями [14]. Кроме того, учитывались продолжительность культивирования фагов и скорость их размножения, что напрямую влияет на возможность масштабирования производства фаговых препаратов.

Оценка литической активности испытуемых холерных фагов была проведена на 60-ти штаммах *V. cholerae* O1 El Tor, 30-ти штаммах биовара classical, 40 штаммах *V. cholerae* O139.

Немаловажным фактором являлась и оценка температурной устойчивости бактериофагов. Фаголи-

заты холерных бактериофагов (концентрация 10^7 – 10^8 БОЕ/мл) инкубировали в течение 24 часов при $+25$ °C (контроль), -20 °C и $+65$ °C, после чего титр фагов определяли методом агаровых слоев.

Для оценки устойчивости к 4,5 мл фаголизата добавляли 0,5 мл хлороформа (1:10), тщательно перемешивали и инкубировали 24 часа при комнатной температуре. После центрифугирования (3000 об/мин, 20 мин) титр фагов определяли в надосадочной жидкости. Контролем служил фаголизат, не обработанный хлороформом, но выдержанный в тех же условиях. Для оценки стабильности холерные фаголизаты хранили 12 месяцев при $+5$ °C и влажности $60\pm 5\%$, контролируя качество каждые 6 месяцев. Эти критерии позволили провести комплексный отбор наиболее перспективных штаммов бактериофагов для дальнейших исследований.

Примеси ЛПС в готовых препаратах бактериофагов (Rostov-M3, Rostov-13, ФБ1) определяли методом иммуоферментного анализа (ИФА) с помощью прямого пероксидазного конъюгата, полученного из лаборатории диагностических препаратов ФКУЗ Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора [2]. За положительный результат принимали среднее значение оптической плотности ($ОП_{ср}$), которое в 2 и более раз превышало значение ОП отрицательного контроля (К). Биологическая безопасность всего исследования обеспечена в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 в полном объеме [12].

Результаты и их обсуждение

1. Характеристика биологических свойств холерных бактериофагов

Анализ литической активности исследуемых холерных бактериофагов выявил их специфичность к различным серогруппам возбудителя. Наибольшую эффективность против биовара El Tor продемонстрировал фаг Rostov-13, показавший 97% литической активности. В отношении классического биовара *V. cholerae* максимальная активность (83,3%) отмечена у фага Rostov-M3, тогда как против штаммов El Tor его эффективность составила 43,3% (26 из 60 тестируемых изолятов). Фаг ФБ1 проявил избирательную активность (50%) исключительно против серогруппы O139.

Специфичность исследуемых бактериофагов подтверждена на штаммах близкородственных бактерий (*Vibrionaceae*, *Enterobacteriaceae*) (таблица 1). Данный эксперимент показал отсутствие лизиса в любых его

проявлениях, что говорит о специфичности вышеперечисленных холерных фагов.

При исследовании жизнеспособности выделенных холерных бактериофагов было установлено, что они обладают высокой чувствительностью к повышенным температурам. Так, нагревание фаголизатов до 65°C полностью инактивирует фаги в течение 30 минут, что

указывает на их термолabileльность и необходимость соблюдения температурного режима при хранении и транспортировке. В то же время, эксперименты показали, что кратковременное хранение фаголизатов при низких температурах (например, при -20°C в течение 24 часов) не приводит к снижению их литической активности (таблица 2).

Таблица 1

Оценка литической активности и специфичности холерных бактериофагов

Вид микроорганизма	Кол-во взятых штаммов	Кол-во лизируемых штаммов / Доля		
		Фар Rostov-13	Фар Rostov-M3	Фар ФБ1
<i>V. cholerae</i> O1 El Tor	60	58 / 97%	26 / 43,3%	0
<i>V. cholerae</i> O1 classical	30	0	25 / 83,3%	0
<i>V. cholerae</i> O139	40	0	0	20 / 50%
<i>V. cholerae</i> nonO1/ nonO139	10	0	0	0
<i>V. methchnikovii</i>	5	0	0	0
<i>V. parahaemolyticus</i>	16	0	0	0
<i>V. mimicus</i>	4	0	0	0
<i>V. alginolyticus</i>	10	0	0	0
<i>Sh. dysenteriae</i>	2	0	0	0
<i>S. typhi</i>	3	0	0	0
<i>S. paratyphi</i>	5	0	0	0
<i>E. coli</i>	4	0	0	0
<i>S. enteritidis</i>	10	0	0	0
<i>Y. enterocolitica</i>	16	0	0	0
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	15	0	0	0

Таблица 2

Воздействие температуры на холерные бактериофаги (по Грациа)

Наименование бактериофага	Индикаторный штамм	Температурный режим/Титр фага (БОЕ/мл)		
		+ 25°C	-20°C	+ 65°C
Rostov-13	<i>V. cholerae</i> El Tor 13169	6,1×10 ⁷	6,3×10 ⁷	0
Rostov-M3	<i>V. cholerae</i> El Tor 20554	7,2×10 ⁸	6,8×10 ⁸	0
ФБ1	<i>V. cholerae</i> O139 18772	5,1×10 ⁸	4,9×10 ⁸	0

Установлено, что обработка фаголизатов хлороформом в течение 24 часов не вызывала снижения титра ни у одного из исследуемых фагов. Это свидетельствует о высокой устойчивости бактериофагов к воздействию хлороформа и определяет возможность его использова-

ния для очистки фаголизатов от бактериальных клеток. Такая обработка позволяет эффективно отделить маточные фаги от остаточных компонентов бактериальной культуры, что является важным этапом в процессе производства фаговых препаратов (таблица 3).

Таблица 3

Воздействие хлороформа на холерные бактериофаги (по Грациа)

Наименование бактериофага	Индикаторный штамм	Титр фага (БОЕ/мл)	
		Хлороформ	Бульон (Контроль)
Rostov-13	<i>V. cholerae</i> El Tor: 13169	6×10 ⁷	6,1×10 ⁷
Rostov-M3	<i>V. cholerae</i> El Tor 20554	7,4×10 ⁸	7,2×10 ⁸
ФБ1	<i>V. cholerae</i> O139 18772	3,8×10 ⁸	5,1×10 ⁸

Данные холерные бактериофаги хранились в форме фаголизатов, предварительно обработанных хлороформом, на протяжении 12 месяцев при температуре 4–8 °С (в условиях холодильника). Для оценки их активности и стабильности титр фагов регулярно определяли с использованием метода Грациа. Результаты показали, что длительное хранение маточных фагов в таких условиях не приводит к значительному снижению их литической активности (таблица 4).

Таблица 4
Устойчивость холерных бактериофагов при хранении (по Грациа)

Название бактериофага	Титр (БОЕ/мл) исходный	Титр (БОЕ/мл) через 6 мес.	Титр (БОЕ/мл) через 12 мес.
Rostov-13	$6,1 \times 10^7$	$6,4 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$
Rostov-M3	$7,2 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$
ФБ1	$5,1 \times 10^8$	$6,7 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$

Это свидетельствует о высокой стабильности бактериофагов при хранении в охлажденном состоянии, что является важным фактором для их практического применения. Также полученные данные подтверждают возможность использования хлороформа для обработки фаголизатов с целью их очистки и последующего длительного хранения без потери активности.

2. Разработка метода получения профилактического препарата

Учитывая вышеизложенное, мы сосредоточились на оптимизации условий культивирования холерных бактериофагов. Основная цель — повышение выхода вирусных частиц при одновременном снижении уровня эндотоксичности будущего препарата.

Для получения высокотитражных фаголизатов с минимальным содержанием ЛПС был разработан поэтапный методический подход, включающий применение питательных сред и индикаторных штаммов (посев в бульон Мартена (рН 7,6), культивирование в термостате при 37 °С в течение 20 ч; пересев на чашки Петри с 1,5% агаром Мартена (рН 7,6) и инкубирование в термостате при 37 °С; пересев выросших колоний в 4,5 мл бульона Мартена (рН 7,6) с последующим выращиванием в термостате в течение 18 ч при 37 °С). После экспозиции концентрация вибрионов достигала 10^8 – 10^9 КОЕ/мл.

1. На чашку Петри с 1,5% агаром Мартена (рН 7,6) толщиной слоя 10 мм вносили 18-ти часовую культуру индикаторного штамма. В растопленный и

остуженный до 45 °С 0,7% агар Мартена (рН 7,6) вносили 0,5 мл культуры индикаторного штамма, который раскатывали по всей поверхности питательной среды, создавая монослой (2-й слой агара). Оставляли на 20 минут при комнатной температуре для застывания агара. Далее на полученный газон культуры наносили раскаткой (маточный) бактериофаг в титре 10^7 – 10^8 БОЕ/мл. Инкубировали в термостате 18 ч при 37 °С.

2. С чашек Петри в асептических условиях скальпелем снимали верхний слой агара с культурой и фагом и вносили в колбу с 500 мл 0,9% физиологического раствора (рН $7,0 \pm 0,2$), из расчета 1 чашка Петри на 100 мл. Данная фракция состоит из бактериофага, живых клеток штамма-хозяина и обломков бактериальных клеток. Для освобождения фаголизата от нелизированных бактерий в пробирки добавляли хлороформ из расчета 1/10. Экспонировали полученную суспензию 30 минут при непрерывном шуттелировании, центрифугировали 30 минут при 5000–6000 об/мин. Собирали полученный супернатант в стерильную емкость.

3. Полученные таким образом супернатанты холерных бактериофагов стерилизовали фильтрацией через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм для удаления обломков бактериальных клеток, живых нелизированных клеток штамма-хозяина, затем проводили ультраочистку с помощью фильтров с диаметром пор 0,22 мкм. После фильтрации фаголизаты очищали от эндотоксинов на хроматографической колонке «Endo Trap HD» (Германия), согласно инструкции. Фаг элюировали буфером (ЕВ), разработанным данной фирмой.

В результате оптимизации условий культивирования урожайность холерных бактериофагов при использовании 0,9% раствора NaCl составила: Rostov-13 $7,4 \times 10^8$ БОЕ/мл, Rostov-M3 $8,2 \times 10^9$ БОЕ/мл, ФБ1 $5,1 \times 10^9$ БОЕ/мл, что выше на один порядок, чем в бульоне Мартена, который использовался при размножении маточных фагов (таблица 5).

Традиционные этапы размножения холерных бактериофагов (таких как Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1) в питательной среде с последующей фильтрацией не обеспечивают полного удаления продуктов жизнедеятельности бактерий. В частности, в препарате может оставаться ЛПС — эндотоксин, входящий в состав мембран холерных вибрионов. Его присутствие способно провоцировать кишечные расстройства и аллергические реакции, что ограничивает профилактическое применение фаговых препаратов.

Кроме того, в отфильтрованных супернатантах нами были обнаружены примеси ЛПС методом ИФА,

препараты брали в двух разведениях — 1:2 и 1:4. Моноспецифические иммуноглобулины, конъюгированные с пероксидазой хрена, направлены к эпитопам ЛПС *V. cholerae* O1 и способны выявлять эндотоксин. В качестве положительного контроля использовали инактивированные микробные клетки двух штаммов *V. cholerae* O1 — № 18963 и № 18512, а в качестве отрицательного контроля — буфер, в котором разводили пробы. Результаты

показали, что Rostov-M3 в разведении 1:2 содержал в своем составе компоненты ЛПС. В препаратах Rostov-13 и ФБ1 его примеси отсутствовали. Следовательно, фаг Rostov-M3 нуждался в дополнительной очистке, которую провели на хроматографической колонке EndoTrap® HD. Результаты повторного ИФА после очистки ЛПС свидетельствовали об отсутствии эндотоксина в данном препарате бактериофагов (таблица 5).

Таблица 5

Результаты оптимизации получения препаратов холерных бактериофагов

Фаголизаты холерных бактериофагов	Урожайность фаговых частиц БОЕ./мл		Результаты ИФА		
	бульон Мартена	0,9% NaCl	Разведение	ОП _{ср}	
Rostov-M3	6,1×10 ⁷	7,4×10 ⁸	До очистки	1:2	0,450±0,02
				1:4	0,212±0,01
ФБ1	7,2×10 ⁸	8,2×10 ⁹		1:2	0,069±0,01
				1:4	0,073±0,03
Rostov-13	5,1×10 ⁸	5,1×10 ⁹		1:2	0,109±0,01
				1:4	0,069±0,03
Rostov-M3к 1:4			После очистки 0,110±0,01 0,043±0,02 0,056±0,04	1:2	0,225±0,02
ФБ1к 1:4				1:2	0,037±0,02
Rostov-13к 1:4				1:2	0,035±0,03
K ⁺ — бак. масса <i>V. cholerae</i> O1 18963 (ctx ⁺)				1:10	1,081±0,01
K ⁺ — бак. масса <i>V. cholerae</i> O1 18512 (ctx ⁺)				1:10	1,140±0,01
K ⁻ — буфер ФСБ				—	0,199±0,02

Примечание: оптическая плотность (ОП_{ср}) представлена в виде средних значений и их стандартных отклонений, K⁺ — положительный контроль, K⁻ — отрицательный контроль.

Заключение

В ходе исследования, направленного на разработку методики получения экспериментального профилактического фагового препарата, были изучены три штамма бактериофагов (Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1), показавшие перспективные данные для дальнейшего их исследования на животных моделях уже в составе смеси. Полученные результаты продемонстрировали, что данные фаги обладают широким спектром литической активности (43–97%) против холерных вибрионов серогрупп O1 и O139, сохраняя при этом высокую специфичность действия, устойчивость к температурным воздействиям и хлороформу. Разработанный методический подход включал оптимизацию условий культивирования и многоступенчатую очистку, что позволило одновременно решить две ключевые задачи: увеличить выход фаговых

частиц на порядок (до 10⁹ БОЕ./мл) и устранить примеси бактериальных эндотоксинов (ЛПС). Эти результаты имеют принципиальное значение для создания безопасного профилактического средства.

Таким образом, проведённое исследование сформировало научно-методическую базу для создания экспериментального профилактического средства. Подобранный комбинация бактериофагов с доказанной эффективностью *in vitro* и отработанной схемой получения фаголизатов представляет собой перспективный подход к профилактике холеры, что особенно актуально для эндемичных территорий и полностью соответствует поставленным исследовательским задачам. Полученные данные также создают предпосылки для разработки фаговых препаратов против других особо опасных инфекций, расширяя возможности применения данной технологии.

Литература

1. Адамс М. Бактериофаги: пер. с англ. — Москва: Изд-во иностранной лит-ры, 1961. — 527 с.
2. Алексеева Л.П., Якушева О.А., Евдокимова В.В., Яговкин М.Э., Зюзина В.П. Твердофазный иммуноферментный анализ (прямой вариант) для выявления токсигенных холерных вибрионов O1, O139 серогрупп // Вестник ПГУ. Биология. — 2022. — № 4. — С. 280–287.
3. Власов В.В., Тикунова Н.В., Морозова В.В. Бактериофаги как терапевтические препараты: что сдерживает их применение в медицине // Биохимия. — 2020. — Т. 85. — № 11. — С. 1587–1600.
4. Гаевская Н.Е., Кудрякова Т.А., Качкина Г.В., Алиева А.А., Саямов С.Р. Отбор бактериофагов для лечения экспериментальной холеры, вызванной классическими холерными вибрионами // Современные наукоемкие технологии. — 2004. — № 3. — С. 11–15.
5. Киселева И.А. Специализированный продукт диетического профилактического питания на основе коктейля бактериофагов: конструирование, технология производства, оценка безопасности и эффективности применения: дис. ... канд. биол. наук 03.02.03. — Москва, 2015.
6. Кругликов В.Д., Гаевская Н.Е., Монахова Е.В., Москвитина Э.А., Агафонова В.В., Савина И.В., Подойницына О.А., Селянская Н.А., Водопьянов А.С., Дуванова О.В., Меньшикова Е.А., Ежова М.И., Шипко Е.С., Евтеев А.В., Казьмина В.С., Бодрая П.В., Сокиркина Е.Н. Анализ особенностей эпидемиологической ситуации по холере в 2024 г. в мире, в Российской Федерации и прогноз ее развития на 2025 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2025. — № 1. — С. 35–47.
7. МР 4.2.0263-21 «Методы работы с бактериофагами микроорганизмов I–IV групп патогенности» [Электронный ресурс]. — URL: <https://informproekt.ru/docs/1304363785/?ysclid=mn1t4bt1v5506767413> (дата обращения 20.03.2026).
8. Погожова М.П., Гаевская Н.Е., Тюрина А.В., Аноприенко А.О. Создание коллекции фагов патогенных вибрионов и её применение в диагностических и профилактических целях // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2023. — Т. 19. — № 3. — С. 37–45.
9. Попова А.Ю., Носков А.К., Ежлова Е.Б., Кругликов В.Д., Монахова Е.В., Чемисова О.С., Лопатин А.А., Иванова С.М., Подойницына О.А., Водопьянов А.С., Левченко Д.А., Савина И.В. Эпидемиологическая ситуация по холере в Российской Федерации в 2023 г. и прогноз на 2024 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2024. — № 1. — С. 76–88.
10. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.alt.ru/tamdoc/16sr0089/?ysclid=mn1ssi6r17893041500> (дата обращения 20.03.2026).
11. Решетникова О.В. Биотехнология культивирования бактериофагов // Вестник науки и образования Северо-Запада России. — 2018. — Т. 4. — № 2. — С. 136–141.
12. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней (в ред. N 4 от 25.05.2022, утверждены Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021) [Электронный ресурс]. — Роспотребнадзор РФ, 2021. — URL: <https://base.garant.ru/400342149/> (дата обращения 20.03.2026).
13. Селянская Н.А., Егиазарян Л.А., Ежова М.И., Пасюкова Н.И., Водопьянов С.О. Анализ устойчивости к антибактериальным препаратам холерных вибрионов, выделенных из объектов окружающей среды в России в 2019 г // Антибиотики и химиотерапия. — 2021. — Т. 66. — № 3–4. — С. 4–11.
14. Федеральные клинические МР «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике» от 21.04.2014 протокол № 5. — Москва, 2014. — 39 с.
15. Bagheri-Josheghani S.B., Bakhshi M. Prevalence of antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: A Meta-analysis [Электронный ресурс]. — 2021. — URL: <https://www.researchsquare.com/article/rs-208720/v1> (date of access: 14.02.2025).
16. Bhandare S., Colom J., Baig A., Ritchie J.M., Bukhari H., Shah M.A., Atterbury R.J. Reviving phage therapy for the treatment of cholera // J. Infect. Dis. — 2019. — Vol. 219. — No. 5. — P. 786–794.

References

1. Adams M. Bakteriofagi: per s angl. Moscow: Izd-vo inostran-noy lit-ry, 1961: 527 (in Russian).
2. Alekseyeva LP, Yakusheva OA, Yevdokimova VV, Yagovkin ME, Zyuzina VP. Tverdogfaznyy immunofermentnyy analiz (pryamoy variant) dlya vyyavleniya toksigennykh kholernykh vibrionov O1, O139 serogrupp. Vestnik PGU. Biologiya 2022; 4:280–287 (in Russian).
3. Vlasov VV, Tikunova NV, Morozova VV. Bakteriofagi kak terapevticheskiye preparaty: chto sderzhivayet ikh primeneniye v meditsine. Biokhimiya 2020; 85(11):1587–1600 (in Russian).
4. Gayevskaya NYe, Kudryakova TA, Kachkina GV, Aliyeva AA, Sayamov SR. Otkor bakteriofagov dlya lecheniya eksperimental'noy kholery, vyzvannoy klassicheskimi kholernymi vibrionami. Sovremennyye naukoymkiye tekhnologii 2004; 3:11–15 (in Russian).
5. Kiseleva IA. Spetsializirovannyy produkt diyeticheskogo profilakticheskogo pitaniya na osnove kokteylya bakteriofagov: konstruirovaniye, tekhnologiya proizvodstva, otsenka bezopasnosti i effektivnosti primeneniya: dis ... kand biol nauk 03.02.03. Moscow, 2015 (in Russian).

6. Kruglikov VD, Gayevskaya NYe, Monakhova YeV, Moskvitina EA, Agafonova VV, Savina IV, Podoyntsina OA, Selyanskaya NA, Vodop'yanov AS, Duvanov OV, Men'shikova YeA, Yezhova MI, Shipko YeS, Yevteyev AV, Kaz'mina VS, Bodraya PV, Sokirina YeN. Analiz osobennostey epidemiologicheskoy situatsii po kholere v 2024 g. v mire, v Rossiyskoy Federatsii i prognoz yeye razvitiya na 2025 g. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2025; 1:35–47 (in Russian).
7. MR 4.2.0263-21 «Metody raboty s bakteriofagami mikroorganizmov I–IV grupp patogennosti». URL: <https://informproekt.ru/docs/1304363785/?ysclid=mn1t4bt1v5506767413> (date of access 20.03.2026) (in Russian).
8. Pogozhova MP, Gayevskaya NYe, Tyurina AV, Anopriyenko AO. Sozdaniye kolleksii fagov patogennykh vibriov i yeyo primeneniye v diagnosticheskikh i profilakticheskikh tselyakh. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova 2023; 19(3):37–45 (in Russian).
9. Popova AYu, Noskov AK, Ezhlova EB, Kruglikov VD, Monakhova EV, Chemisova OS, Lopatin AA, Ivanova SM, Podoyntsina OA, Vodopyanov AS, Levchenko DA, Savina IV. Epidemiologicheskaya situatsiya po kholere v Rossiyskoy Federatsii v 2023 g. i prognoz na 2024 g.. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2024; 1:76–88 (in Russian).
10. Resheniye Soveta Yevraziyskoy ekonomicheskoy komissii ot 3 noyabrya 2016 g. № 89 «Ob utverzhdenii Pravil provedeniya issledovaniy biologicheskikh lekarstvennykh sredstv Yevraziyskogo ekonomicheskogo soyuza». URL: www.alta.ru/tamdoc/16sr0089/?ysclid=mn1ssi6r17893041500 (date of access 20.03.2026) (in Russian).
11. Reshetnikova OV. Biotekhnologiya kul'tivirovaniya bakteriofagov. Vestnik nauki i obrazovaniya Severo-Zapada Rossii 2018; 4(2):136–141 (in Russian).
12. SanPiN 3.3686-21 «Sanitarno-epidemiologicheskiye trebovaniya po profilaktike infektsionnykh bolezney (v red N 4 ot 25.05.2022, utverzhdeny Postanovleniyem Glavnogo gosudarstvennogo sanitarnogo vracha RF ot 28.01.2021). Rospotrebnadzor RF, 2021. URL: <https://base.garant.ru/400342149/> (data obrashcheniya 20.03.2026) (in Russian).
13. Selyanskaya NA, Yegiazaryan LA, Yezhova MI, Pasyukova NI, Vodop'yanov SO. Analiz ustoychivosti k antibakterial'nym preparatam kholernykh vibriov, vydelennykh iz ob»yektov okruzhayushchey sredy v Rossii v 2019 g. Antibiotiki i khimioterapiya 2021; 66(3–4):4–11 (in Russian).
14. Federal'nyye klinicheskiye MR «Ratsional'noye primeneniye bakteriofagov v lechebnoy i protivoepidemicheskoy praktike» ot 21.04.2014 protokol № 5. Moscow, 2014: 39 (in Russian).
15. Bagheri-Joshaghani SB, Bakhshi M. Prevalence of antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: A Meta-analysis 2021; URL: <https://www.researchsquare.com/article/rs-208720/v1> (date of access: 14.02.2025).
16. Bhandare S, Colom J, Baig A, Ritchie JM, Bukhari H, Shah MA, Atterbury RJ. Reviving phage therapy for the treatment of cholera. J Infect Dis 2019; 219(5):786–794.

DEVELOPMENT OF STAGES FOR OBTAINING HOLEREA BACTERIOPHAGES FOR INCLUSION IN THE COMPOSITION OF A PREVENTIVE DRUG

A.V. TYURINA, N.E. GAEVSKAYA, M.P. POGOZHOVA, V.V. EVDOKIMOVA,
O.A. YAKUSHEVA, YU.V. SIZOVA, A.O. ANOPRIENKO, O.A. BOGDAN

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

Cholera remains a global health threat, especially in regions with poor sanitary conditions. The growth of antibiotic resistance in *Vibrio cholerae* requires the development of alternative methods of treatment and prevention, among which the use of bacteriophages is a promising direction. The aim of the work was to develop a methodological approach to obtaining an experimental prophylactic drug based on cholera bacteriophages. In this work, three virulent cholera bacteriophages (Rostov-M3, Rostov-13 and FB1) with high lytic activity and specificity to *V. cholerae* serogroups O1 and O139 were investigated. It was shown that the phages retain activity during storage (4–8 °C, 12 months), are resistant to chloroform, but are heat-labile (inactivation at 65 °C). An optimized cultivation technique in a physiological solution made it possible to increase the titer of phage particles to 10⁹ PFU/ml, and multi-stage purification (filtration, chromatography) ensured the absence of toxins in the phage lysates. Control over the absence of lipopolysaccharide (LPS) was confirmed by ELISA. The developed methodological approach made it possible to achieve two key results: to increase the yield of phage particles (by an order of magnitude) and to ensure their purification from bacterial endotoxins. The result of the conducted research is the creation of a scientific and methodological basis for further study of the safety and effectiveness of promising cholera bacteriophages Rostov-M3, Rostov-13 and FB1 on animal models, including as part of the experimental mixture. The results obtained open up new opportunities for the development of phage preparations not only against cholera, but also other particularly dangerous infections.

Keywords: cholera bacteriophages, lytic activity, purification of phagolysates, prevention of cholera

Address:

Tyurina A.V.
researcher, acting head of the bacteriophage laboratory,
Department of Diagnostic Preparations, Rostov-on-Don
Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor
E-mail: turina_av@antiplague.ru

Для цитирования:

Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Погожова М.П., Евдокимова В.В., Якушева О.А., Сизова Ю.В., Аноприенко А.О., Богдан О.А. Разработка этапов получения холерных бактериофагов для включения в состав профилактического препарата. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2026; 22(1):80–87.

For citation:

Tyurina A.V., Gaevskaya N.E., Pogozhova M.P., Evdokimova V.V., Yakusheva O.A., Sizova Yu.V., Anoprienko A.O., Bogdan O.A. Development of stages for obtaining holera bacteriophages for inclusion in the composition of a preventive drug. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2026; 22(1):80–87 (in Russian).

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ДРОЖЖЕЙ «КОДЗИ» ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СПИРТА ИЗ РИСА

К.Р. АЛИЕВ*, Н.А. КАБАНОВА, Н.А.ТИНИКАШВИЛИ, Н.Ф. БИРАГОВА, Р.К. АЛИЕВ

ФГБОУ ВО «Северо-Кавказский горно-металлургический институт»
(государственный технологический университет), Владикавказ

Стандартная технология этилового спирта из зернового крахмалсодержащего сырья предусматривает ферментативный гидролиз молекул крахмала в сбраживаемые сахара с использованием глюкоамилолитических ферментных препаратов [1, 2]. Исключить полностью перечисленные выше технологические операции возможно только в случае применения возбудителей спиртового брожения способных вырабатывать спирт непосредственно из крахмала, условно минуя стадии водно-тепловой обработки, охлаждения и осахаривания. В данном отношении вызывают интерес специализированные дрожжи — «Кодзи» (*Kodji Nomikai NEO*). Дрожжи «Кодзи» представляют собой сухую сублимированную смесь спиртовых дрожжей, витаминов, питательных солей и специальной заквасочной плесневой культуры, содержащей все необходимое для холодного осахаривания и сбраживания любого крахмалсодержащего сырья. В данной работе впервые исследовано влияние дрожжей «Кодзи» на выход этилового спирта из крахмалсодержащего сырья — спиртового сусла, получаемого из различных сортов риса.

Ключевые слова: рис; этиловый спирт; спиртовые дрожжи «Кодзи».

Введение

Этиловый спирт — основное сырье для производства ликёро-водочных изделий и других спиртосодержащих продуктов, находит широкое применение во многих отраслях пищевой и фармацевтической промышленности в качестве основного и вспомогательного сырья. Одним из ключевых факторов, определяющих количественные и качественные показатели этилового спирта, является характеристика применяемых возбудителей брожения. Традиционно это дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, способные обеспечить высокий выход этилового спирта, требуя при этом высокой концентрации сбраживаемых сахаров в сусле.

Материалы и методы

Объектом исследования в данной работе являются дрожжи «Кодзи», используемые для сбраживания различных образцов спиртового сусла. В качестве кон-

трольного образца применялись дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, штамм DY 7221, торговая марка «Фермиол». Для получения различных образцов сусла использовали зерна риса сортов: «Бурый», «Жасмин» и «Круглозёрный» основные характеристики которых представлены в таблице 1.

Таблица 1

Физико-химические показатели риса

Наименование исследуемых сортов риса	Влажность, %	Условная крахмалистость, %
Бурый	9,76	70,0
Жасмин	11,8	83,6
Круглозёрный	11,98	68,7

Все исходные, промежуточные и конечные показатели продукта определяли методами технокимического контроля, принятыми в спиртовом производстве.

На стадии разваривания и осахаривания использовались ферментные препараты: Grainzyme FL и Biozyme 800L. Для получения контрольных образцов сусла использовалась технологическая схема, принятая в современном спиртовом производстве. При получении исследуемых образцов из технологической схемы был исключён отдельный процесс осахаривания. Сбраживание всех образцов сусла проводилось периодическим способом в течение 72 часов.

© 2026 г. Алиев К.Р., Кабанова Н.А., Тиникашвили Н.А., Бирагова Н.Ф., Алиев Р.К.

* Автор для переписки:

Алиев Камилъ Рамазанович

канд. техн. наук, доцент кафедры «Химия и промышленная биотехнология», ФГБОУ ВО «Северо-Кавказский горно-металлургический институт (государственный технологический университет)»

E-mail: kamilsnipe@mal.ru

В процессе сбраживания суслу во всех исследуемых и контрольных образцах анализировали изменение содержания сухих веществ, изменение содержания этанола и изменение концентрации активных дрожжевых клеток.

Изменение содержания сухих веществ в исследуемых и контрольных образцах определяли рефрактометрическим методом, на рефрактометре ИРФ-3 [4].

Объемную долю этилового спирта определяли согласно ГОСТ 3639-79 «Спиртовые растворы» ареометром для спирта АСП [3].

Изменение концентрации дрожжевых клеток в бражке определяли микроскопическим методом с использованием счётной камеры Горяева, предварительно проведя окрашивание навески раствором йода [3, 4] с целью определения содержания гликогена в дрожжевых клетках. Очень важно чтобы, гликоген в дрожжевых клетках был распределён равномерно.

Результаты

Результаты исследования изменения содержания сухих веществ в сусле показал, что у всех образцов в процессе сбраживания происходит снижение содержания сухих веществ, а в образцах, сбраживаемых при помощи дрожжей «Кодзи», это протекает более выражено.

Исследование динамики содержания этанола во всех образцах показывает неизменное нарастание его концентрации, и лишь в контрольных образцах оно протекает менее интенсивно, чем в образцах сбраживаемых дрожжами «Кодзи».

Динамика прироста дрожжевой биомассы в течение 48–50 часов демонстрирует стремительный рост относительно всех исследуемых и контрольных образцов суслу. Но в случае с исследуемыми образцами количественные значения концентрации клеток дрожжей более значительны, по сравнению с контрольными образцами.

Результаты исследований представлены в виде таблиц и диаграмм, характеризующих:

- изменение содержания сухих веществ в сусле с использованием дрожжей «Кодзи» (рисунок 1);
- изменение содержания сухих веществ в сусле с использованием дрожжей «Фермиол» (рисунок 2);
- изменение содержания этанола в сусле с использованием дрожжей «Кодзи» (рисунок 3);
- изменение содержания этанола в сусле с использованием дрожжей «Фермиол» (рисунок 4);
- изменение концентрации дрожжевых клеток при использовании дрожжей «Кодзи» (рисунок 5);
- изменение концентрации дрожжевых клеток при использовании дрожжей «Фермиол» (рисунок 6).

Таблица 2

Изменение содержания сухих веществ в сусле

Сорта риса	Продолжительность брожения, час	1	12	24	36	48	60	72
		с использованием дрожжей «Кодзи»						
Бурый		16,7	14,0	9,7	7,7	4,4	1,6	1,0
Жасмин		17,4	13,7	10,8	7,5	4,5	1,9	1,2
Круглозёрный		16,8	13,9	9,4	7,1	4,2	1,7	0,5
с использованием дрожжей «Фермиол»								
Бурый		16,7	14,3	10,7	8,6	4,6	2,3	1,4
Жасмин		17,4	14,9	11,2	8,8	4,7	2,5	1,7
Круглозёрный		16,8	14,2	10,6	8,2	4,4	2,0	0,8

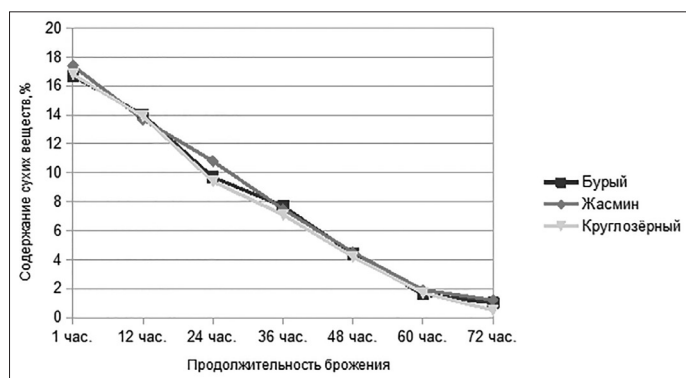


Рис. 1. Изменение содержания сухих веществ в сусле с использованием дрожжей «Кодзи»

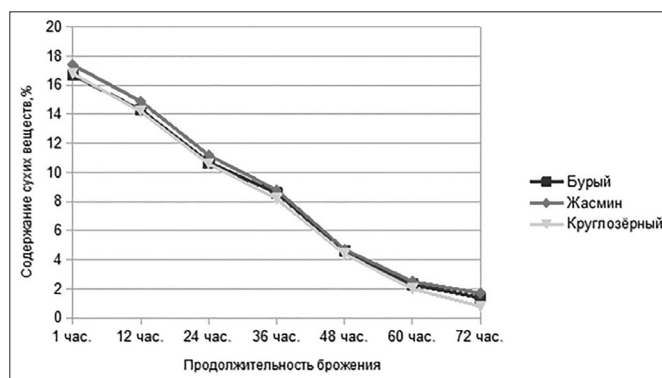


Рис. 2. Изменение содержания сухих веществ в сусле с использованием дрожжей «Фермиол»

Обе диаграммы (см. рисунок 1 и рисунок 2) отражают вполне закономерную тенденцию снижения содержания сбраживаемых сухих веществ в сусле с возрастанием продолжительности брожения.

Из рисунка 1 видно, что изменение содержания сухих веществ в сусле с использованием дрожжей «Кодзи» в течение ближайших 2–2,5 суток происходит гораздо интенсивнее. К моменту завершения процесса брожения интенсивность сбраживания снижалась, и через трое суток брожение окончательно прекращалось.

Из представленных образцов риса, к моменту завершения процесса брожения, худший результат показывает зёрна риса сорта «Жасмин», показавший слабый результат уже в начале брожения. Лучший результат был получен в опытах с рисом сорта «Круглозёрный», сусло из которого оказалось более благоприятным для развития дрожжей «Кодзи». Рис сорта «Бурый» в данном эксперименте показал промежуточные результаты по эффективности усвоения дрожжами углеводов.

На рисунке 2 показана динамика снижения содержания сухих веществ в сбраживаемом дрожжами «Фермиол» сусле. Из диаграммы следует, что лучшие результаты по усвоению сухих сбраживаемых веществ демонстрируют дрожжи «Фермиол» на сусле, приготовленном из зёрен сорта «Круглозёрный», в сравнении с другими сортами риса, достигая минимального значения содержания сухих веществ — 0,8% по окончании брожения.

Одним из значимых критериев эффективности процесса спиртового брожения является накопление этанола в зрелой бражке. Полученные результаты исследований были структурированы в форме таблицы 3, а закономерности протекания данного процесса наглядно продемонстрированы на диаграммах (см. рисунок 1 и рисунок 2), результаты в которых следует интерпретировать таким образом что, чем больше полученное значение содержания этанола в конце брожения, тем полнее происходит усвоение сбраживаемых веществ спиртовыми дрожжами.

Таблица 3

Изменение содержания этанола в рисовой бражке, % мас

Сорта риса	Продолжительность брожения, час	1	12	24	36	48	60	72
		с использованием дрожжей «Кодзи»						
Бурый		0	2,2	3,5	5,7	8,3	8,4	8,4
Жасмин		0	2,5	4,2	6,5	8,4	8,5	8,5
Круглозёрный		0	2,2	3,4	5,5	7,8	8,1	8,1
с использованием дрожжей «Фермиол»								
Бурый		0	0,4	3,5	5,6	6,4	7,1	7,6
Жасмин		0	0,5	4,2	6,2	7,1	8,0	8,2
Круглозёрный		0	0,4	3,8	6,0	6,6	7,4	7,7

На рисунке 3 видно, что накопление этанола во всех трёх образцах сусла происходит активно уже в течение первых 12 часов брожения. Наилучшую эффективность накопления этанола в зрелой бражке демонстрирует об-

разец, выработанный из сорта «Жасмин» — 8,5% мас. Меньшую эффективность демонстрируют образцы, выработанные из сортов риса «Круглозёрный» — 8,4% мас и «Бурый» — 8,1% мас соответственно.

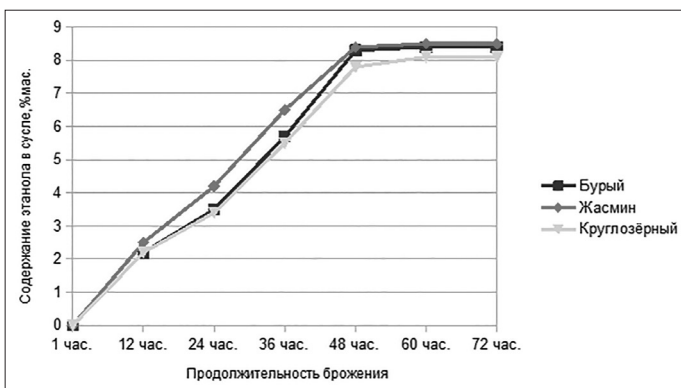


Рис. 3. Изменение содержания этанола в сусле с использованием дрожжей «Кодзи»

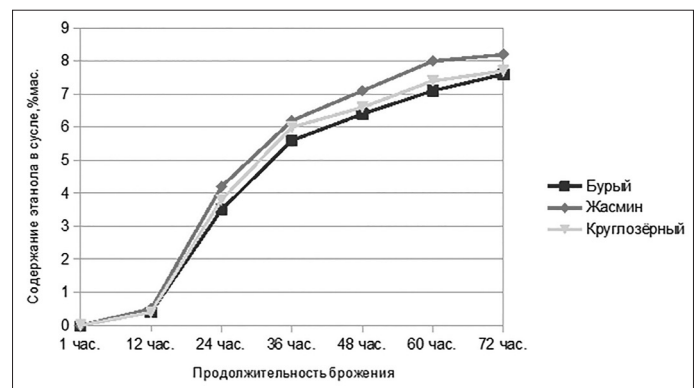


Рис. 4. Изменение содержания этанола в сусле с использованием дрожжей «Фермиол»

Из рисунка 4 следует, что при сбраживании практически всех образцов спиртового сусле за первые 12 часов брожения, накопление этанола в сусле происходит в незначительных количествах, протекая стадию адаптации (лаг-фазу), после чего брожение протекает более интенсивно.

Лучший результат по показателю накопление этилового спирта дрожжами «Фермиол», был продемонстрирован в образце из сорта «Жасмин» — 8,2% мас. Сорт риса «Бурый» по данному параметру также показал худший результат — 7,6% мас.

Также одним из важных показателей, характеризующего качество протекания процессов спиртового брожения является изменение концентрации биомассы дрожжей в сбраживаемом сусле. Данный показатель важен тем, что обеспечивает качественное протекание спиртового брожения, гарантируя максимальный выход целевого продукта. Поэтому чем больше концентрация здоровых, жизнеспособных дрожжевых клеток, тем выше качественные и количественные показатели этилового спирта, получаемого в результате анаэробного сбраживания углеводов в рисовом сусле.

Таблица 4

Изменение концентрации биомассы дрожжей в рисовой бражке, млн/см³

Сорта риса	Продолжительность брожения, час						
	1	12	24	36	48	60	72
с использованием дрожжей «Кодзи»							
Бурый	15	91	136	147	167	131	100
Жасмин	15	98	138	152	181	154	108
Круглозёрный	15	71	120	134	156	110	84
с использованием дрожжей «Фермиол»							
Бурый	15	64	94	114	130	114	91
Жасмин	15	84	115	128	143	122	101
Круглозёрный	15	52	86	109	125	105	82

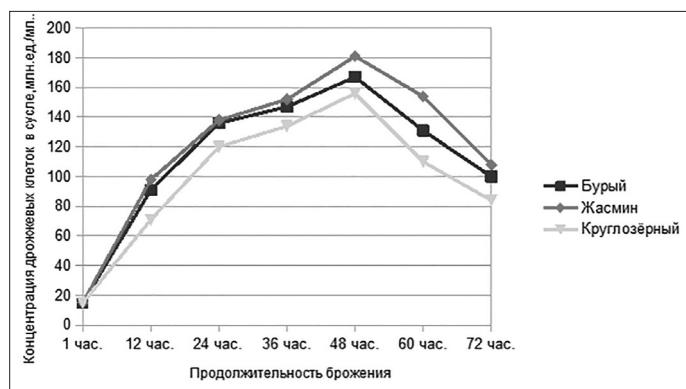


Рис. 5. Изменение концентрации дрожжевых клеток при использовании дрожжей «Кодзи»

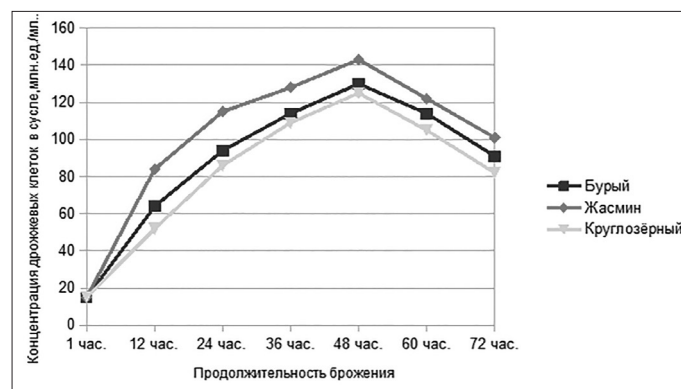


Рис. 6. Изменение концентрации дрожжевых клеток при использовании дрожжей «Фермиол»

Изменение концентрации дрожжевых клеток «Кодзи» за весь период брожения показан рисунке 5. Интересная особенность данной разновидности дрожжей в сокращённой лаг-фазе, т.к. при внесении дрожжевой закваски в сусле через 20–30 минут наблюдается экспоненциальная фаза, длящаяся до 24 часов. По прошествии суток интенсивность брожения несколько снижается и протекает в таком режиме ещё 24 часа. Через двое суток после внесения закваски интенсивность брожения за-

медляется, т.к. концентрация здоровых, жизнеспособных дрожжевых клеток, в единице объёма сусле существенно уменьшается, в сравнение с количеством мёртвых клеток.

Наибольшая концентрация дрожжевых клеток наблюдается к 48 часам брожения как у дрожжей «Кодзи» (рисунок 5), так и у дрожжей «Фермиол» (рисунок 6). При этом, несмотря на общую для всех исследуемых образцов риса закономерность, мы отмечаем, что лучшими показателями в обоих случаях характеризуется сусле,

полученное из зерна сорта «Жасмин». Несколько худшие показатели отмечены у сусла, полученного из риса сорта «Бурый» — 147 млн/см³ при сбраживании дрожжами «Кодзи», и 114 млн/см³ при сбраживании дрожжами «Фермиол».

Проведённые исследования выявили эффективность применения дрожжей «Кодзи» для получения спирта из риса. По сравнению с дрожжами «Фермиол» они продемонстрировали меньшие требования к исходным показателям сбраживаемого сусла: содержанию сухих и сбраживаемых веществ и настоящей концентрации этилового спирта. При этом, полученные в ходе лабораторных исследований результаты, для риса сорта «Жасмин», по всем исследуемым показателям, оказались лучше, чем для риса сортов «Бурый» и «Круглозёрный».

Заключение

Был проведен сравнительный анализ эффективности применения дрожжей «Кодзи» при производстве спирта из зерна риса сортов «Бурый», «Жасмин» и «Круглозёрный». Анализировались такие показатели как: изменение содержания сухих веществ в сусле, изменение содержания этилового спирта и изменение концентрации дрожжевых клеток.

Проведённое исследование сусла на содержание суммарных и видимых сухих веществ показало, что содержание дрожжевых клеток на начальных этапах брожения было одинаковым, как для исследуемых образцов сусла, сбраживаемых дрожжами «Кодзи», так и для контрольных образцов, перерабатываемых дрожжами «Фермиол». По завершении брожения этот показатель заметно снизился для каждого из случаев в отдельности. Заметное снижение содержания сухих веществ отмечено у зерна риса сорта «Жасмин», менее выраженное снижение содержания сухих веществ отмечается у зерна риса сортов «Круглозёрный» и «Бурый».

Анализируя показатель изменения содержания этилового спирта при брожении, было установлено, что наиболее эффективное накопление спирта наблюдается в зрелой бражке, полученной при сбраживании дрожжами «Кодзи» сусла из риса сорта «Жасмин». Несколько менее эффективно эти же дрожжи трансформируют сбраживаемые сахара в сусле из риса сортов: «Круглозёрный» и «Бурый».

В то же время, по показателю изменения концентрации дрожжевых клеток в сусле наблюдается нарастание концентрации тел дрожжевых клеток как в исследуемых, так и контрольных образцах. При детальном анализе результатов можно констатировать, что прирост

биомассы дрожжей «Кодзи» протекает более интенсивно и выражено, чем у дрожжей «Фермиол».

Полученные результаты исследования подтверждают высокий производственный потенциал применения дрожжей «Кодзи» для получения этилового спирта из риса, в особенности из зёрен сорта «Жасмин» и менее всего из зёрен сортов «Круглозёрный».

Данное исследование проведено в рамках государственной научно-исследовательской работы на период 2022–2027 год по теме: «Физические и биохимические методы совершенствования технологии бродильных производств».

Литература

1. Алиев К.Р. Влияние комплекса ферментных препаратов на осахаривание при производстве спирта из зерна кукурузы // Экологическая безопасность и сохранение генетических ресурсов растений и животных России и сопредельных территорий: Сб. материалов XIV Всерос. науч. конф. с междунар. участием. — Владикавказ, 2023. — С. 18–24.
2. Бирагова Н.Ф. Изучение влияния дрожжей местной селекции и различных ферментных препаратов на выход спирта из пшеницы // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2023. — Т. 19. — № 2. — С. 28–31.
3. ГОСТ 3639-79. Растворы водно-спиртовые. Методы определения концентрации этилового спирта. — Москва: ИПК Изд-во стандартов, 2004. — 12 с.
4. Польшагина Г.В. Технохимический контроль спиртового и ликеро-водочного производств. — Москва: Колос, 1999. — 333 с.

References

1. Aliyev KR. Vliyaniye kompleksa fermentnykh preparatov na osakharivaniye pri proizvodstve spirta iz zerna kukuruzy. Ekologicheskaya bezopasnost' i sokhraneniye geneticheskikh resursov rasteniy i zivotnykh Rossii i sopredel'nykh territoriy: Sb materialov XIV Vseros nauch konf s mezhdunar uchastiyem. Vladikavkaz, 2023:18–24 (in Russian).
2. Biragova NF. Izucheniye vliyaniya drozhzhey mestnoy selektsii i razlichnykh fermentnykh preparatov na vykhod spirta iz pshenitsy. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YrA Ovchinnikova 2023; 19(2):28–31 (in Russian).
3. GOST 3639-79. Rastvory vodno-spirtovyeye. Metody opredeleniya kotsentratsii etilovogo spirta. Moscow: IPK Izd-vo standartov, 2004: 12 (in Russian).
4. Polygalina GV. Tekhnokhimicheskiy kontrol' spirtovogo i likero-vodochnogo proizvodstv. Moscow: Kolos, 1999: 333 (in Russian).

A STUDY ON THE EFFECTIVENESS OF «KOJI» YEAST FOR PRODUCING ALCOHOL FROM RICE

K.R. ALIEV, N.A. KABANOVA, N.A. TINIKASHVILI, N.F. BIRAGOVA, R.K. ALIYEV

North Caucasian Mining and Metallurgical Institute (State Technological University), Vladikavkaz

Standard technology for producing ethyl alcohol from starchy grain raw materials involves the enzymatic hydrolysis of starch molecules into fermentable sugars using glucoamylolytic enzymes. Completely eliminating the above-mentioned process steps is only possible with the use of alcoholic fermentation agents capable of producing alcohol directly from starch, bypassing the stages of heat-water treatment, cooling, and saccharification. A specialized yeast, Koji Nomikai NEO, is of interest in this regard. Koji yeast is a dry, freeze-dried mixture of distiller's yeast, vitamins, nutrient salts, and a special starter mold culture containing everything necessary for the cold saccharification and fermentation of any starchy raw material. This study, for the first time, examines the effect of Koji yeast on ethyl alcohol yield from a starchy raw material – spirit wort obtained from various rice varieties.

Keywords: rice; ethyl alcohol; Koji alcohol yeast.

Address:

Aliev K.R., Ph.D in Engineering
associate professor, department of chemistry and industrial
biotechnology, North Caucasus Mining and Metallurgical
Institute (State Technological University)
E-mail: kamilsnipe@mal.ru

Для цитирования:

Алиев К.Р., Кабанова Н.А., Тиникашвили Н.А., Бирагова Н.Ф., Алиев Р.К. Исследование эффективности применения дрожжей «Кодзи» для получения спирта из риса. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2026; 22(1):88–93.

For citation:

Aliev K.R., Kabanova N.A., Tinikashvili N.A., Biragova N.F., Aliyev R.K. A study on the effectiveness of «Koji» yeast for producing alcohol from rice. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2026; 22(1):88–93 (in Russian).

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ ДЕЗИНФЕКЦИИ

Ю.В. СИЗОВА*, А.В. ТЮРИНА, М.П. ПОГОЖОВА, Н.Е. ГАЕВСКАЯ

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

Адаптационные способности и экологическая вариативность бактерий способствуют формированию устойчивых штаммов, что ведет к распространению полирезистентных вариантов и обуславливает необходимость регулярного поиска и разработки новых антибактериальных средств, в том числе фагосодержащих. Фаговые препараты приобретают все большую популярность в США и Европе, являясь эффективным, относительно недорогим, экологичным методом контроля бактериальной популяции. В представленном обзоре проанализированы данные по применению бактериофагов как самостоятельно (использование бактериофагов в качестве средств биологической дезинфекции, показывает высокую эффективность в лечебных организациях в отношении наиболее распространенных возбудителей бактериальной природы, в том числе и особо опасных инфекций), так и в комплексе с другими компонентами (антибиотиками, пробиотиками, химическими дезинфицирующими средствами и солнечным светом). Показана перспективность исследований в данном направлении, особенно в области генетической модификации фагов для увеличения спектра хозяев и повышения литической активности, что позволяет разрабатывать фаговые препараты широкого спектра действия, способные взаимодействовать с несколькими штаммами бактерий, с улучшенной стабильностью, эффективностью и безопасностью, а также более устойчивых к воздействию различных факторов окружающей среды.

Ключевые слова: бактериофаги; вирусы; дезинфекция; инфекционные заболевания.

Возбудители инфекционных болезни бактериальной этиологии, несмотря на все предпринимаемые меры, наносят значительный экономический и социальный вред обществу, в связи с чем для борьбы с ними используют различные антибактериальные средства, в том числе асептики, антибиотики и дезинфектанты. Однако адаптационные способности и экологическая вариативность бактерий способствуют формированию устойчивых штаммов, что ведет к распространению полирезистентных вариантов и обуславливает необходимость регулярного поиска и разработки новых антибактериальных средств [1]. Используемые в настоящее время дезинфицирующие средства широкого спектра действия преимущественно имеют химическую природу и, в зависимости от действующего вещества, могут достаточно легко воспламеняться, окислять металлы, вызывать раздражение и оказывать канцерогенный и/или токсичный эффект на живые организмы [41]. Мно-

гие исследователи заинтересованы в разработке нового экологичного дезинфицирующего средства, как альтернативы химическому методу, поскольку с каждым годом возрастают требования безопасности, направленные на сохранение здоровья человека, животных и окружающей среды от воздействия опасных химических соединений [7, 13]. В связи с этим становится актуальным использование препаратов избирательного действия, в том числе фагосодержащих, что является перспективной областью исследований во всем мире.

Подтверждением актуальности данного направления могут служить обзоры Global Phage Therapy market компании MarketWatch, в которых представлена информация о мировом рынке бактериофагов: в 2020 г. он составлял 29 млн., а в 2023 г. уже 68 млн. долларов. При этом прогнозируется рост к 2032 г. до 236 млн. долларов при среднегодовом темпе прироста 14,8%, что объясняется увеличением распространенности устойчивых к антибиотикам бактериальных инфекций и значительно повышающемся спросе на альтернативные методы лечения, такие как фаготерапия. Растущее признание фагов в качестве эффективного средства борьбы с бактериальными патогенами в различных сферах применения, технологический прогресс в области инженерии фагов и методов их производства, разработка модифицированных фагов с повышенной специфичностью и эффективностью

© 2026 г. Сизова Ю.В., Тюрина А.В., Погожова М.П., Гаевская Н.Е.

* **Автор для переписки:**

Сизова Юлия Владимировна

канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

E-mail: sizova_yuv@antiplague.ru

способствуют расширению рынка. Усовершенствования в области выделения, очистки и производства повышают доступность и надежность бактериофагов в качестве терапевтических средств, что способствует не только улучшению результатов лечения, но и росту популярности и распространенности фагов в различных отраслях [33].

Одним из таких направлений является дезинфекция с применением фагов, представляющая собой естественную «зеленую» технологию, часто называемую биоконтролем. На сегодняшний день практически все фаги, входящие в состав препаратов для биоконтроля, являются дикими, выделенными из природных источников и не подвергавшиеся последующей генетической модификации. Фаговые препараты приобретают все большую популярность в США и Европе, являясь эффективным, относительно недорогим, экологичным и социально ориентированным методом контроля бактериальной популяции [14, 29].

Цель обзора — рассмотреть опыт применения бактериофагов для оценки возможности их использования в дезинфекции различных объектов.

Бактериофаги были открыты Феликсом д'Эрелем в 1917 г. По своей природе они являются вирусами, избирательно поражающими специфические клетки бактерий. Как и все вирусы, фаги представляют собой частицы, состоящие из нуклеиновой кислоты, заключенной в белковый капсид, который защищает генетический материал и способствует его доставке в клетку-хозяина. Эта биологическая система, повсеместно распространенная в природе, очень разнообразна. Являясь самыми многочисленными обитателями планеты, фаги не просто паразиты, но и симбионты, регуляторы, образующие сеть передачи генетической информации в масштабах биосферы, обеспечивающие эволюцию бактерий. По приблизительным подсчетам количество бактериофагов составляет от 10^{30} до 10^{32} . Учеными показано, что процесс взаимодействия с бактериями продолжается более трех миллиардов лет и каждую секунду на планете происходит около 10^{25} фаговых инфекций бактериальных клеток [29].

Фаги разделяют на вирулентные или умеренные в зависимости от выполняемого ими биологического цикла — литического или лизогенного соответственно [30]. Вирулентные фаги наиболее предпочтительны для использования в профилактических и лечебных целях против бактериальных инфекций. Внедрение генома фага в бактериальную клетку с последующим размножением фаговых частиц и лизисом зараженной клетки (литический цикл развития вирулентных фагов), обуславливает антибактериальный эффект фаговых препаратов. Вы-

свобождаясь во внешнюю среду в результате лизиса, бактериофаги вновь заражают и лизируют клетки. Этот процесс повторяется до полного уничтожения патогенных бактерий [7]. Учитывая это литические фаги считаются более подходящими для биоконтроля, в то время как лизогенные фаги способны участвовать в горизонтальном переносе генов между бактериями. Этот процесс обуславливает потенциальную угрозу распространения, например, генов устойчивости к противомикробным препаратам, генов токсинопродукции или других факторов патогенности между микроорганизмами посредством бактериальной трансдукции.

Потенциальные области применения бактериофагов, как дезинфицирующего компонента, включают борьбу с патогенами, уменьшение их популяций на различных поверхностях, в жидкостях или аэрозолях, уменьшение/элиминацию бактериальных биопленок [37]. В настоящее время на практике основная часть биопрепаратов на основе бактериофагов предлагается для профилактики [2], использования вирулентных бактериофагов в качестве дополнения или альтернативы в профилактике и традиционной терапии в период повышения устойчивости бактерий к антибиотикам [42], дезинфекции и контроля бактериальных патогенов при производстве пищевых продуктов и их хранении [22], но более интересен вопрос обеззараживания различных поверхностей и сточных вод, в том числе и в медицинских учреждениях, которому и посвящен данный обзор.

В исследованиях преимущественно используют смеси бактериофагов (так называемые фаговые коктейли), поскольку такие препараты имеют более широкий спектр хозяев, чем монофаги, и снижают риск возникновения бактериальной резистентности к препарату, тем самым повышая его пролонгированный эффект за счет прикрепления разных фагов к разным поверхностным рецепторам бактерий [34]. Повысить эффективность дезинфекции можно и при комбинировании традиционных методов с воздействием бактериофагов. К настоящему времени изучается сочетанное влияние фагов с антибиотиками [18], пробиотиками [21], химическими дезинфицирующими средствами [46], солнечным светом [36]. Также для исследователей в этой области представляет интерес улучшение процессов очистки воды за счет применения фагов и стандартных препаратов [44].

Так, De Soir S. et al. (2024), рассматривая угрозу инфицирования медицинских имплантов различными бактериями, способную привести к возникновению воспалительного процесса, и необходимости хирургической обработки раны с последующим длительным лечением

антибиотиками, показали, что совместное использование фагов с ципрофлоксацином, меропенемом или цефтазидимом более эффективно для уничтожения биопленок *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 на титановых образцах *in vitro*, чем применение любого из этих препаратов по отдельности [18].

D'Accolti M. et al. (2018) изучали возможность применения бактериофагов в качестве дезинфектантов при плановой уборке больниц в сочетании с экологичными моющими средствами — PCHS (система гигиенической пробиотической очистки), содержащей непатогенные бактерии рода *Bacillus*, много лет используемые для плановой уборки в ряде итальянских больниц. Дополнительное использование фагов позволило ускорить процесс ремодуляции микробиома на обработанных поверхностях (что было показано в результатах *in vitro* и *in situ*), обеспечивая более эффективную и быструю деконтаминацию *Staphylococcus* spp. по сравнению с применением только пробиотиков или только фагов [21].

В ходе исследования китайских ученых Shi Y. et al. (2024) был разработан коктейль из бактериофагов, направленных на уничтожение двух карбапенемрезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* (CRKP), ST11 KL47 и ST11 KL64, наиболее часто встречающихся в больницах Пекина. Препарат использовался после химической дезинфекции в качестве дополнительного дезинфицирующего средства в отделении интенсивной терапии для пациентов с респираторными заболеваниями в виде аэрозоля, созданного с помощью ультразвуковой небулизации. Результаты наблюдений показали, что существенных различий в численности *K. pneumoniae* до и через 6 ч после химической дезинфекции хлорсодержащим препаратом не было, в то время как после дополнительной обработки фаговым коктейлем наблюдалось значительное снижение концентрации возбудителя [39].

Важным является аспект использования бактериофагов не только для уничтожения свободных бактерий в процессе дезинфекции больничных поверхностей и медицинского оборудования, но и для разрушения биопленок, как наиболее часто встречаемой формы существования бактериального сообщества, обеспечивающее повышенную устойчивость к различным факторам воздействия [26]. Исследования комбинированного использования фагов и химических дезинфицирующих средств, таких как бензалкония хлорид и гипохлорит натрия, против *P. aeruginosa* показало повышение эффективности удаления бактериального загрязнения поверхностей и снижение регенерации биопленки [12].

Однако и самостоятельное использование бактериофагов в качестве средств биологической дезинфекции показывает высокую эффективность в лечебных организациях, в том числе для купирования вспышек бактериальных инфекций [4]. Так, Хайрулин И.Н. (2003) исследуя воздух и смывы со стен выявил принципиальное сходство выделяемой микрофлоры в основных помещениях хирургических блоков и раневого отделяемого при инфекционных осложнениях «чистых» операционных ран. Проведя оценку фагочувствительности выделенных культур, автор сконструировал набор, представляющий собой смесь равных объемов моновалентных бактериофагов против наиболее часто обнаруживаемых золотистого стафилококка, синегнойной, кишечной палочек и протей. Оценив высокий терапевтический эффект набора был создан аэрозоль с помощью аэрозольного генератора. Обработка в палатах хирургического отделения, пред- и операционных помещениях показала высокую эффективность такого метода, приближающуюся к 100% уже через 2 часа [8]. Также показана полная элиминация возбудителей, чувствительных к синегнойному и сальмонеллезному монофагам, в течение суток с выраженным снижением количества новых случаев заболевания [5].

Чтобы смоделировать эффективность регулярной дезинфекции поверхностей в больницах D'Accolti M et al. (2021) провели тесты *in vitro*, оценив активность бактериофагов в отношении ограниченного количества бактерий на различных типах непористых поверхностей, встречающихся в больницах (кафель, пластик, металл, стекло и т.д.). Результаты показали, что изучаемые фаги способны уменьшать количество бактерий на обработанных поверхностях до 90% уже через 1 час после обработки. Через 6 часов бактерии практически не обнаруживались. Таким образом можно было обеззараживать все типы тестируемых поверхностей [20].

Проводятся исследования и с возбудителями особо опасных инфекций. Так, Rashid M.H. et al. (2012) оценили воздействие коктейля YPP-100, в состав которого входили чумные бактериофаги YpP-G, Y, R и YpsP-PST, на экспериментально зараженные смесью трех генетически различных штаммов *Yersinia pestis* поверхностей (покровные стекла, гипсокартон и пластины из нержавеющей стали). Обработка неразбавленным YPP-100 полностью уничтожила возбудителя на всех поверхностях, тем самым показав возможность использования данного метода при контаминации поверхностей чумным микробом [34].

Учитывая, что существует необходимость в устойчивых и экологически безопасных вариантах уничтоже-

ния микробных загрязнений не только в стационарах, но и в других средах, в том числе и водных объектах окружающей среды, проводятся исследования по изучению возможности использования бактериофагов для их обеззараживания. Фаги в последнее время все активнее стали применять в качестве нового инструмента для борьбы с загрязнением воды, мониторинга, очистки пресных и сточных вод [16, 27]. Использование химической дезинфекции может приводить к образованию в водных объектах побочных продуктов, включая тригалогенметаны, галогенуксусные кислоты, N-нитрозодиметиламин, броматы и хлориды, которые могут оказывать серьезное воздействие на окружающую среду и здоровье человека, и при этом не всегда гарантирует полную элиминацию возбудителя [23]. Известным фактом является образование бактериальных биопленок *P. aeruginosa*, засоряющих фильтры на очистных сооружениях, которые обычно обрабатывают хлором. Zhang and Hu (2013) показали, что обработка хлором в концентрации 210 мг/л снижает на 80% образование новых биопленок, но никак не влияет на уже существующие. Авторы предложили использовать смесь РНК-содержащих бактериофагов, которые подавляли образование новых и уменьшали количество уже существующих биопленок на 36–80%. Однако в сочетании с хлорированием они оказались эффективнее, что позволило снизить более чем на 90% появление новых биопленок, и способствовало активному разрушению уже образованных. Полученные данные сопоставимы с результатами других исследователей [35, 46].

Дезинфицирующие средства часто используются в сочетании с моющими средствами. Они удаляют загрязнения с поверхностей, тем самым способствуя проявлению антибактериального эффекта, однако при этом могут несколько снижать эффективность самих дезинфектантов [24]. Активные вещества, входящие в состав моющих средств, оказывают влияние и на бактерицидную эффективность фаговых препаратов. Song J. и др. (2021) показали влияние различных моющих средств на фаговый препарат SDQ. При этом они отмечали, что ионные детергенты снижали активность или полностью его инактивировали, а неионные детергенты (Triton X-100, Tween 20 и Brij 35) сохраняли полную литическую активность исследуемого препарата [41].

Aghaee B.L. (2021) показал, что бактериофаги синегнойной палочки в большем количестве содержатся в сточных водах и в субстратах, ими загрязненных, и обладают более высокой литической активностью, чем содержащиеся в других объектах окружающей среды (почва, вода) [10]. При очистке сточных вод

фаги, нацеленные на *Escherichia coli* с множественной лекарственной устойчивостью, за несколько часов сокращают популяцию микроорганизмов на 99%, повысив эффективность очистки и сохранив при этом полезные микробные сообщества [25].

Al-Jassim N. et al. (2018) показано, что воздействие комбинации бактериофагов с солнечным ультрафиолетом не только ускоряет инактивацию супербактерии *E. coli* PI-7, сокращая время и снижая необходимый уровень интенсивности солнечного излучения, но и является безопасным для окружающей среды. В связи с тем, что бактериофаг также восприимчив к солнечному облучению из-за нарушения экспрессии генов, отвечающих за защитные механизмы, авторы предложили его использование на последнем этапе очистки сточных вод. Например, в открытых резервуарах для хранения сточных вод после хлорирования, уничтожающего большую часть патогенных бактерий, и последующей инсоляции в течение примерно 4 часов с добавлением бактериофага перед повторным использованием или сбросом очищенных вод. Такое время воздействия, по мнению авторов, не позволит бактериям выработать устойчивость к бактериофагам, поскольку их метаболическая активность и эффективность размножения будут снижены под воздействием солнечного света [21]. Положительно оценено использование специфических бактериофагов в сочетании с солнечным светом для удаления из воды устойчивых к подавляющему большинству антибиотиков штаммов *P. aeruginosa* [36].

Исследуя сточные воды больниц Ирана в течение шести месяцев Sadeqi S. et al. (2024) выявили высокий уровень различных бактериальных патогенов в необработанном пруду-отстойнике. Добавление фагового коктейля, состоящего из бактериофагов, выделенных там же, помогло полностью устранить большую часть патогенов (почти нулевые показатели в течение 1–4 месяцев после обработки). Далее наблюдалось незначительное увеличение общей популяции бактерий, которое авторы объясняют поступлением новых сточных вод из больницы и увеличением количества фагоустойчивых вариантов [38].

Литические фаги доказали свою эффективность на очистных сооружениях и в процессах с использованием активного ила: уничтожая бактерии, вызывающие пенообразование, они применяются в качестве пеногасителей и средств для удаления биомассы ила [40].

При обеззараживании сточных вод фаги играют решающую роль не только в устранении патогенных микроорганизмов, но и биопленок, тем самым повышая

эффективность очистки и качество воды [11]. Удаление биопленок с использованием фагов вызывает особый интерес. Здесь могут применяться как активные, так и пассивные способы обработки. Пассивный способ подразумевает наличие достаточной заражающей дозы (не менее 10^8 БОЕ./мл) для наступления эффекта за один цикл развития. В этом случае в обеззараживаемый материал добавляется столько фагов, сколько необходимо для достижения желаемого уровня гибели бактерий и биопленки. Активный метод рассчитан на пополнение бактериофагов за счет репликации в клетках-хозяина. При этом потребуется значительно меньшее начальное количество фаговых частиц, но более продолжительное время контакта, а скорость дезинфекции будет зависеть от способности выхода потомства и литических свойств бактериофагов [9].

Большинство способов биоконтроля сильно зависит от концентрации препарата, но она со временем может снижаться, в то время как количество вирулентного бактериофага только увеличивается, поскольку он продолжает размножаться и заражать бактерии-мишени. Положительным моментом применения фагов для дезинфекции является практически полное отсутствие необходимости последующего обезвреживания дезинфицирующего компонента. Как только все бактерии будут уничтожены бактериофаг элиминируется [15].

Несмотря на положительные результаты, полученные при использовании бактериофагов для уничтожения микроорганизмов в водной среде, необходимо учитывать влияние различных физических и химических факторов (например, pH, температуры, ультрафиолетового излучения, ионов и солености, наличия биологически активных веществ и т.д.), восприимчивость к которым может сильно отличаться даже внутри семейств фагов и усложнять их применение в динамичных или экстремальных условиях [17]. Чаще всего такие факторы оказывают влияние на прикрепление фаговых частиц к рецепторам хозяина, повреждают структурные компоненты фага (например, головки, оболочки хвоста), инициируют потерю липидов или повреждение нуклеиновых кислот [28].

Помимо этого, применение фаговых препаратов в очистных сооружениях в реальных условиях сопряжено с рядом трудностей — узкая специфичность и появление устойчивых вариантов хозяина, сложность выделения и производства подходящих фагов, неспецифическая адсорбция, распад фагов. Так же отрицательным моментом является тот факт, что повсеместное распространение, изобилие, устойчивость и универсальность фагов делают их идеальными горизонтальными переносчиками генов

между бактериями, даже принадлежащими к разным таксонам или обитающими в разных биотопах. Этот момент требует особого изучения, поскольку напрямую касается безопасности природных экосистем и здоровья человека, особенно в отношении распространения генов, ассоциированных с устойчивостью к антибиотикам, тем самым обуславливая необходимость тщательной разработки подходов к применению фагов в окружающей среде и на производстве, максимально снижая потенциальные риски. Обилие фагов, кодирующих гены вирулентности и антимикробные пептиды, повышает вероятность их трансдукции в бактериях, обитающих в сточных водах. Кроме того, многие виды микроорганизмов не поддаются культивированию, что ограничивает возможности выделения новых рас фагов [32].

Совместная эволюция фагов и их носителей может также привести к потере фагом вирулентности или развитию устойчивости у носителя [19]. Бактерии способны вырабатывать широкий спектр механизмов для предотвращения заражения фагами на разных этапах процесса, например, для подавления адсорбции фага на рецепторах хозяина и синтеза внутриклеточных белков, препятствующих транскрипции и созреванию генома фага [31].

Использование бактериофагов в медицинских организациях сопряжено, помимо общебиологических, с рядом дополнительных проблем. Брусина Е.В. с соавт. (2018) отмечала необходимость осуществления регулярного микробиологического мониторинга для обеспечения эффективной дезинфекции бактериофагами, проведение которого связано с рядом трудностей, таких как необходимость использования только коммерческих бактериофагов, устойчивость больничных штаммов к поступившим фаговым препаратам, необходимость постоянной оценки чувствительности используемых бактериофагов в связи с непрерывным изменением штаммов-возбудителей, отсутствие экспресс-методов контроля качества дезинфекции и т.д. [3].

Однако несмотря на все минусы, потенциал использования фагов в дезинфекции весьма высок и достаточно перспективен. Для нейтрализации выше перечисленных отрицательных моментов применения фагов особое внимание уделяется генной инженерии. Генетическая модификация для увеличения спектра хозяев и повышения литической активности позволяет разрабатывать фаговые препараты широкого спектра действия, способные взаимодействовать с несколькими штаммами бактерий, с улучшенной стабильностью, эффективностью и безопасностью, а также более устойчивых к воздействию различных факторов окружающей

среды. Создание фагов, не содержащих антигенные детерминанты, также имеет важное значение для снижения риска распространения резистентности [45]. Растущая доступность модифицированных фагов с различной специфичностью к хозяевам и улучшенными литическими свойствами предоставляет исследователям более универсальные инструменты для борьбы с возбудителями бактериальных инфекций, тем самым способствуя расширению области их применения [33].

Заключение

Таким образом, распространение полирезистентных вариантов микроорганизмов обуславливает необходимость регулярного поиска и разработки новых антибактериальных средств, в том числе, основанных на бактериофагах, которые являются естественными обитателями окружающей среды и не наносят ей такого ущерба, как применение химических препаратов, активно используемых в настоящее время. В представленном обзоре проанализированы данные по применению бактериофагов как самостоятельно, так и в комплексе с другими компонентами, при проведении биологической дезинфекции поверхностей, в том числе в медицинских учреждениях, и в водных объектах. Согласно представленной информации, это направление исследований является перспективным, так как открывает новые возможности в борьбе с возбудителями инфекционных заболеваний.

Литература

1. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Матосова Е.В., Ляпун И.Н. Фенотипическая пластичность бактерий как стратегия резистентности и объект современных антимикробных технологий (обзор) // Современные технологии в медицине. — 2019. — Т. 11. — № 2. — С. 164–182.
2. Багаева В.В., Попова В.М., Пашкова Г.С., Исаджанян К.Е., Никитин В.В., Жиленков Е.А. Изучение эффективности и безопасности применения антимикробных средств // Исследования и практика в медицине. — 2015. — Т. 2. — № 3. — С. 35–42.
3. Брусина Е.Б., Дроздова О.М., Алешкин А.В., Шагин Д.А., Тутельян А.В., Акимкин В.Г. Проблемы комплексного применения бактериофагов для профилактики и лечения // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2018. — № 3. — С. 11–15.
4. Вакарина А.А. Литические свойства бактериофагов основных возбудителей бактериальных инфекций: дисс. ... канд. мед. наук 1.5.11. — Тюмень, 2022.
5. Дроздова О.М., Брусина Е.Б. Применение бактериофагов в эпидемиологической практике: взгляд через столетие // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2010. — № 5. — С. 20–24.
6. Литусов Н.В. Бактериофаги. Иллюстрированное учебное пособие — Екатеринбург: Изд-во УГМА, 2012. — 38 с.
7. Сульдина Е.В., Феоктистова Н.А., Майоров П.С., Мاستиленко А.В., Богданов И.И. Бактериофаги для биологической дезинфекции. Монография. — Ульяновск: Ульяновский гос. аграр. ун-т им. П.А. Столыпина, 2023. — 240 с.
8. Хайруллин И.Н. Роль микрофлоры хирургического отделения в развитии послеоперационных осложнений хирургических ран, и их коррекция с помощью бактериофагов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук 14.00.27. — Казань, 2003.
9. Abedon S.T., Thomas-Abedon C. Phage therapy pharmacology // J. Curr. Pharm. Biotechnol. — 2010. — Vol. 11. — P. 28–47.
10. Aghae B.L., Mirzaei M.K., Alikhani M.Y., Mojtahedi A. Sewage and sewage-contaminated environments are the most prominent sources to isolate phages against *Pseudomonas aeruginosa* // BMC Microbiol. — 2021. — Vol. 21. — No. 1. — Art. 132. doi: 10.1186/s12866-021-02197-z.
11. Azzam M.I., ElSayed E.E., Gado M.M. New phage-based wastewater pollution control solution with safe reuse // Environ. Nanotechnol. Monit. Manag. — 2024. — Vol. 21. — Art. 100951. doi: 10.1016/j.enmm.2024.100951.
12. Bock L.J., Wand M.E., Sutton J.M. Varying activity of chlorhexidine-based disinfectants against *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates and adapted strains // J. Hospital Infect. — 2016. — Vol. 93. — No. 1. — P. 42–48.
13. Broncano-Lavado A., Santamaría-Corral G., Esteban J., García-Quintanilla M. Advances in bacteriophage therapy against relevant multidrug-resistant // Pathogens. Antibiotics. — 2021. — Vol. 10. — No. 6. — Art. 672. doi: 10.3390/antibiotics10060672.
14. Centers for Disease Control and Prevention. Reopening guidance for cleaning and disinfecting public spaces, workplaces, businesses, schools, and homes. Atlanta, Georgia: Centers for Disease Control and Prevention; 2020 [Электронный ресурс]. — URL: https://stacks.cdc.gov/view/cdc/87981/cdc_87981_DS1.pdf (дата обращения 25.07.2025).
15. Clokie M.R.J., Millard A.D., Letarov A.V., Heaphy S. Phages in nature // Bacteriophage. — 2011. — Vol. 1. — P. 31–45.
16. Dantas C.W.D., Martins D.T., Nogueira W.G., Alegria O.V.C., Ramos R.T.J. Tools and methodology to *in silico* phage discovery in freshwater environments // Front Microbiol. — 2024. — Vol. 15. — Art. 1390726. doi: 10.3389/fmicb.2024.1390726.
17. Dedrick R.M., Guerrero-Bustamante C.A., Garlena R.A., Russell D.A., Ford K., Harris K., Gilmour K.C., Soothill J., Jacobs-Sera D., Schooley R.T., Hatfull G.F., Spencer

- H. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus* // Nature Med. — 2019. — Vol. 25. — P. 730–733.
18. De Soir S., Parée H., Kamarudin N.H.N., Wagemans J., Lavigne R., Braem A., Merabishvili M., De Vos D., Pirnay J.-P., Van Bambeke F. Exploiting phage-antibiotic synergies to disrupt *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms in the context of orthopedic infections // Microbiol. Spectr. — 2024. — Vol. 12. — e03219-23. doi: 10.1128/spectrum.03219-23.
 19. Diard M., Hardt W.D. Evolution of bacterial virulence // FEMS Microbiol. Rev. — 2017. — Vol. 41. — P. 679–697.
 20. D'Accolti M., Soffritti I., Mazzacane S., Caselli E. Bacteriophages as a potential 360-degree pathogen control strategy // Microorganisms. — 2021. — Vol. 9. — No. 2. — Art. 261. doi: 10.3390/microorganisms9020261.
 21. D'Accolti M., Soffritti I., Piffanelli M., Bisi M., Mazzacane S., Caselli E. Efficient removal of hospital pathogens from hard surfaces by a combined use of bacteriophages and probiotics: Potential as sanitizing agents // Infect. and Drug Resistance. — 2018. — Vol. 11. — P. 1015–1026.
 22. Garvey M. Bacteriophages and food production: biocontrol and biopreservation options for food safety // Antibiotics. — 2022. — Vol. 11. — No. 10. — Art. 1324. doi: 10.3390/antibiotics11101324.
 23. Ghafoor D., Khan Z., Khan A., Ualiyeva D., Zaman N. Excessive use of disinfectants against COVID-19 posing a potential threat to living beings // Curr. Res. Toxicol. — 2021. — Vol. 2. — P. 159–168.
 24. Gosling R.J., Mawhinney I., Vaughan K., Davies R.H., Smith R.P. Efficacy of disinfectants and detergents intended for a pig farm environment where *Salmonella* is present // Vet. Microbiol. — 2017. — Vol. 204. — P. 46–53.
 25. Guo X., Tang N., Lei H., Fang Q., Liu L., Zhou Q., Song C. Metagenomic analysis of antibiotic resistance genes in untreated wastewater from three different hospitals // Front Microbiol. — 2021. — Vol. 12. — Art. 709051. doi: 10.3389/fmicb.2021.709051.
 26. Huang S.S., Datta R., Platt R. Risk of acquiring antibiotic-resistant bacteria from prior room occupants // Arch. Internal Med. — 2006. — Vol. 166. — No. 18. — P. 1945–1951.
 27. Hu M., Xing B., Yang M., Han R., Pan H., Guo H., Liu Z., Huang T., Du K., Jiang S., Zhang Q., Lu W., Huang X., Zhou C., Li J., Song W., Deng Z., Xiao M. Characterization of a novel genus of jumbo phages and their application in wastewater treatment // iScience. — 2023. — Vol. 26. — Art. 106947. doi: 10.1016/j.isci.2023.106947.
 28. Jończyk E., Klak M., Międzybrodzki R., Górski A. The influence of external factors on bacteriophages: Review // Folia Microbiol. — 2011. — Vol. 56. — P. 191–200.
 29. Kang Y., Wang J., Wang Y., Li Z. Profiles of phage in global hospital wastewater: Association with microbial hosts, antibiotic resistance genes, metal resistance genes, and mobile genetic elements // Sci. Total Environ. — 2024. — Vol. 926. — Art. 171766. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.171766.
 30. Kasman L.M., Porter L.D. Bacteriophages // StatPearls [Internet]. USA: StatPearls Publishing, 2025.
 31. Labrie S.J., Samson J.E., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms // Nat. Rev. Microbiol. — 2010. — Vol. 8. — P. 317–327.
 32. Liao H., Liu C., Zhou S., Liu C., Eldridge D.J., Ai C., Wilhelm S.W., Singh B.K., Liang X., Radosevich M., Yang Q.E., Tang X., Wei Z., Friman V.P., Gillings M., Delgado-Baquerizo M., Zhu Y.G. Prophage-encoded antibiotic resistance genes are enriched in human-impacted environments // Nature Commun. — 2024. — Vol. 15. — Art. 8315. doi: 10.1038/s41467-024-52450-y.
 33. Phage therapy market report. Global forecast from 2025 To 2033 [Электронный ресурс]. — URL: <https://dataintel.com/report/global-phage-therapy-market> (дата обращения 25.07.2025).
 34. Rashid M.H., Revazishvili T., Dean T., Butani A., Verratti K., Bishop-Lilly K.A., Sozhamannan S., Sulakvelidze A., Rajanna C. A *Yersinia pestis*-specific, lytic phage preparation significantly reduces viable *Y. pestis* on various hard surfaces experimentally contaminated with the bacterium // Bacteriophage. — 2012. — Vol. 8. — No. 9. — P. 168–177.
 35. Reyneke B., Havenga B., Waso-Reyneke M., Waso-Reyneke M., Khan S., Khan W. Benefits and challenges of applying bacteriophage biocontrol in the consumer water cycle // Microorganisms. — 2024. — Vol. 12. — No. 6. — Art. 1163. doi: 10.3390/microorganisms12061163.
 36. Reyneke B., Khan S., Fernández-Ibáñez P., Khan W. Podoviridae bacteriophage for the biocontrol of *Pseudomonas aeruginosa* in rainwater // Environmen. Sci. & Technol. — 2020. — Vol. 6. — P. 87–102.
 37. Rogovski P., Cadamuro R. D., da Silva R., de Souza E. B., Bonatto C., Viancelli A., Michelon W., Elmahdy E. M., Treichel H., Rodríguez-Lázaro D., Fongaro G. Uses of bacteriophages as bacterial control tools and environmental safety indicators // Front. Microbiol. — 2021. — Vol. 2. — Art. 793135. doi: 10.3389/fmicb.2021.793135.
 38. Sadeqi S., Hashemi Shahraki A., Nikkhahi F., Javadi A., Amin Marashi S.M. Application of bacteriophage cocktails for reducing the bacterial load of nosocomial pathogens in hospital wastewater // Iran J. Microbiol. — 2022. — Vol. 14. — No. 3. — P. 395–401.
 39. Shi Y., Zhang W., Li L., Wu W., Li M., Xiao K., Wang K., Sheng Z., Xie F., Wang X., Shi X., Tong Y., Xie L. Evaluation of phage-based decontamination in respiratory intensive care unit environments using ddPCR and 16S rRNA targeted sequencing techniques // Front. Cell Infect. Microbiol. — 2024. — Vol. 14. — Art. 1442062. doi: 10.3389/fcimb.2024.1442062.
 40. Soliman R.M., Othman B.A., Shoman S.A., Azzam M.I., Gado M.M. Biocontrol of multi-drug resistant pathogenic

- bacteria in drainage water by locally isolated bacteriophage // BMC Microbiol. — 2023. — Vol. 23. — No. 1. — Art. 118. doi: 10.1186/s12866-023-02847-4.
41. Song J., Ruan H., Chen L., Jin Y., Zheng J., Wu R., Sun D. Potential of bacteriophages as disinfectants to control of *Staphylococcus aureus* biofilms // BMC Microbiol. — 2021. — Vol. 21. — No. 1. — Art. 57. doi: 10.1186/s12866-021-02117-1.
 42. Swift S.M., Reid K.P., Donovan D.M., Ramsay T.G. Thermophile lytic enzyme fusion proteins that target *Clostridium perfringens* // Antibiotics. — 2019. — Vol. 8. — No. 4. — Art. 214. doi: 10.3390/antibiotics8040214.
 43. Vikram A., Woolston J., Sulakvelidze A. Phage biocontrol applications in food production and processing // Curr. Issues Mol. Biol. — 2021. — Vol. 40. — P. 267–302.
 44. Wu B., Rong W., Fane A.G. The roles of bacteriophages in membrane-based water and wastewater treatment processes: a review // Water Res. — 2017. — Vol. 110. — P. 120–132.
 45. Yoo S., Lee K.M., Kim N., Vu T.N., Abadie R., Yong D. Designing phage cocktails to combat the emergence of bacteriophage-resistant mutants in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* // Microbiol. Spectr. — 2024. — Vol. 12. — e0125823. doi: 10.1128/spectrum.01258-23.
 46. Zhang Y., Hu Z. Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with bacteriophages and chlorine // Biotechnol. Bioeng. — 2013. — Vol. 110. — P. 286–295.
 8. Khayrullin IN. Rol' mikroflory khirurgicheskogo otdeleniya v razvitiy posleoperatsionnykh oslozhneniy khirurgicheskikh ran, i ikh korrektsiya s pomoshch'yu bakteriofagov: Avto-ref dis ... kand med nauk 14.00.27. Kazan', 2003 (in Russian).
 9. Abedon ST, Thomas-Abedon C. Phage therapy pharmacology. J Curr Pharm Biotechnol 2010; 11:28–47.
 10. Aghaee BL, Mirzaei MK, Alikhani MY, Mojtahedi A. Sewage and sewage-contaminated environments are the most prominent sources to isolate phages against *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Microbiol 2021; 21(1):132. doi: 10.1186/s12866-021-02197-z.
 11. Azzam MI, ElSayed EE, Gado MM. New phage-based wastewater pollution control solution with safe reuse. Environ Nanotechnol Monit Manag 2024; 21:100951. doi: 10.1016/j.enmm.2024.100951.
 12. Bock LJ, Wand ME, Sutton JM. Varying activity of chlorhexidine-based disinfectants against *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates and adapted strains. J Hospital Infect 2016; 93(1):42–48.
 13. Broncano-Lavado A, Santamaría-Corral G, Esteban J, García-Quintanilla M. Advances in bacteriophage therapy against relevant multidrug-resistant. Pathogens. Antibiotics 2021; 10(6):672. doi: 10.3390/antibiotics10060672.
 14. Centers for Disease Control and Prevention. Reopening guidance for cleaning and disinfecting public spaces, workplaces, businesses, schools, and homes. Atlanta, Georgia: Centers for Disease Control and Prevention; 2020. URL: https://stacks.cdc.gov/view/cdc/87981/cdc_87981_DS1.pdf (date of access 25.07.2025).
 15. Clokie MRJ, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S. Phages in nature. Bacteriophage 2011; 1:31–45.
 16. Dantas CWD, Martins DT, Nogueira WG, Alegria OVC, Ramos RTJ. Tools and methodology to *in silico* phage discovery in freshwater environments. Front Microbiol 2024; 15:1390726. doi: 10.3389/fmicb.2024.1390726.
 17. Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, Russell DA, Ford K, Harris K, Gilmour KC, Soothill J, Jacobs-Sera D, Schooley RT, Hatfull GF, Spencer H. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. Nature Med 2019; 25:730–733.
 18. De Soir S, Parée H, Kamarudin NHN, Wagemans J, Lavigne R, Braem A, Merabishvili M, De Vos D, Pirnay J-P, Van Bambeke F. Exploiting phage-antibiotic synergies to disrupt *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms in the context of orthopedic infections. Microbiol. Spectr 2024; 12:e03219-23. doi: 10.1128/spectrum.03219-23.
 19. Diard M, Hardt WD. Evolution of bacterial virulence. FEMS Microbiol Rev 2017; 41:679–697.
 20. D'Accolti M, Soffritti I, Mazzacane S, Caselli E. Bacteriophages as a potential 360-degree pathogen control strategy. Microorganisms 2021; 9(2):261. doi: 10.3390/microorganisms9020261.

References

1. Andryukov BG, Somova LM, Matosova YeV, Lyapun IN. Fenotipicheskaya plastichnost' bakteriy kak strategiya rezistentnosti i ob'yekt sovremennykh antimikrobnnykh tekhnologiy (obzor). Sovremennyye tekhnologii v meditsine 2019; 11(2):164–182 (in Russian).
2. Bagayeva VV, Popova VM, Pashkova GS, Isadzhanian KYe, Nikitin VV, Zhilenkov YeL. Izucheniye effektivnosti i bezopasnosti primeneniya antimikrobnnykh sredstv. Issledovaniya i praktika v meditsine 2015; 2(3):35–42 (in Russian).
3. Brusina YeB, Drozdova OM, Aleshkin AV, Shagin DA, Tutel'yan AV, Akimkin VG. Problemy kompleksnogo primeneniya bakteriofagov dlya profilaktiki i lecheniya. Epidemiologiya i infeksionnyye bolezni 2018; 3:11–15 (in Russian).
4. Vakarina AA. Liticheskiye svoystva bakteriofagov osnovnykh vzbuditeley bakterial'nykh infeksiy: diss ... kand med nauk 15.11. Tyumen', 2022 (in Russian).
5. Drozdova OM, Brusina YeB. Primeneniye bakteriofagov v epidemiologicheskoy praktike: vzglyad cherez stoletiyе. Epidemiologiya i infeksionnyye bolezni 2010; 5:20–24 (in Russian).
6. Litusov NV. Bakteriofagi. Illyustrirovannoye uchebnoye posobiye. Yekaterinburg: Izd-vo UGMA, 2012: 38 (in Russian).
7. Sul'dina YeV, Feoktistova NA, Mayorov PS, Mastilenko AV, Bogdanov II. Bakteriofagi dlya biologicheskoy dezinfektsii. Monografiya. Ul'yanovsk: Ul'yanovskiy gos. agrar. un-t im. P.A. Stolypina, 2023: 240 (in Russian).

21. D'Accolti M, Soffritti I, Piffanelli M, Bisi M, Mazzacane S, Caselli E. Efficient removal of hospital pathogens from hard surfaces by a combined use of bacteriophages and probiotics: Potential as sanitizing agents. *Infect and Drug Resistance* 2018; 11:1015–1026.
22. Garvey M. Bacteriophages and food production: biocontrol and biopreservation options for food safety. *Antibiotics* 2022; 11(10):1324. doi: 10.3390/antibiotics11101324.
23. Ghafoor D, Khan Z, Khan A, Ualiyeva D, Zaman N. Excessive use of disinfectants against COVID-19 posing a potential threat to living beings. *Curr Res Toxicol* 2021; 2:159–168.
24. Gosling RJ, Mawhinney I, Vaughan K, Davies RH, Smith RP. Efficacy of disinfectants and detergents intended for a pig farm environment where *Salmonella* is present. *Vet Microbiol* 2017; 204:46–53.
25. Guo X, Tang N, Lei H, Fang Q, Liu L, Zhou Q, Song C. Metagenomic analysis of antibiotic resistance genes in untreated wastewater from three different hospitals. *Front Microbiol* 2021; 12:709051. doi: 10.3389/fmicb.2021.709051.
26. Huang SS, Datta R, Platt R. Risk of acquiring antibiotic-resistant bacteria from prior room occupants. *Arch. Internal Med* 2006; 166(18):1945–1951.
27. Hu M, Xing B, Yang M, Han R, Pan H, Guo H, Liu Z, Huang T, Du K, Jiang S, Zhang Q, Lu W, Huang X, Zhou C, Li J, Song W, Deng Z, Xiao M. Characterization of a novel genus of jumbo phages and their application in wastewater treatment. *iScience* 2023; 26:106947. doi: 10.1016/j.isci.2023.106947.
28. Jończyk E, Klak M, Międzybrodzki R, Górski A. The influence of external factors on bacteriophages: Review. *Folia Microbiol* 2011; 56:191–200.
29. Kang Y, Wang J, Wang Y, Li Z. Profiles of phage in global hospital wastewater: Association with microbial hosts, antibiotic resistance genes, metal resistance genes, and mobile genetic elements. *Sci Total Environ* 2024; 926:171766. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.171766.
30. Kasman LM, Porter LD Bacteriophages. StatPearls. USA: StatPearls Publishing, 2025.
31. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8:317–327.
32. Liao H, Liu C, Zhou S, Liu C, Eldridge DJ, Ai C, Wilhelm SW, Singh BK, Liang X, Radosevich M, Yang QE, Tang X, Wei Z, Friman VP, Gillings M, Delgado-Baquerizo M, Zhu YG. Prophage-encoded antibiotic resistance genes are enriched in human-impacted environments. *Nature Commun* 2024; 15:8315. doi: 10.1038/s41467-024-52450-y.
33. Phage therapy market report. Global forecast from 2025 To 2033. URL: <https://dataintelo.com/report/global-phage-therapy-market> (date of access 25.07.2025).
34. Rashid MH, Revazishvili T, Dean T, Butani A, Verratti K, Bishop-Lilly KA, Sozhamannan S, Sulakvelidze A, Rajanna C. A *Yersinia pestis*-specific, lytic phage preparation significantly reduces viable *Y. pestis* on various hard surfaces experimentally contaminated with the bacterium. *Bacteriophage* 2012; 8(9):168–177.
35. Reyneke B, Havenga B, Waso-Reyneke M, Waso-Reyneke M, Khan S, Khan W. Benefits and challenges of applying bacteriophage biocontrol in the consumer water cycle. *Microorganisms* 2024; 12(6):1163. doi: 10.3390/microorganisms12061163.
36. Reyneke B, Khan S, Fernández-Ibáñez P, Khan W. Podoviridae bacteriophage for the biocontrol of *Pseudomonas aeruginosa* in rainwater. *Environmen Sci & Technol* 2020; 6:87–102.
37. Rogovski P, Cadamuro R D, da Silva R, de Souza E B, Bonatto C, Viancelli A, Michelin W, Elmahdy E M, Treichel H, Rodríguez-Lázaro D, Fongaro G. Uses of bacteriophages as bacterial control tools and environmental safety indicators. *Front. Microbiol* 2021; 2:793135. doi: 10.3389/fmicb.2021.793135.
38. Sadeqi S, Hashemi Shahraki A, Nikkhahi F, Javadi A, Amin Marashi SM. Application of bacteriophage cocktails for reducing the bacterial load of nosocomial pathogens in hospital wastewater. *Iran J Microbiol* 2022; 14(3):395–401.
39. Shi Y, Zhang W, Li L, Wu W, Li M, Xiao K, Wang K, Sheng Z, Xie F, Wang X, Shi X, Tong Y, Xie L. Evaluation of phage-based decontamination in respiratory intensive care unit environments using ddPCR and 16S rRNA targeted sequencing techniques. *Front Cell Infect Microbiol* 2024; 14:1442062. doi: 10.3389/fcimb.2024.1442062.
40. Soliman RM, Othman BA, Shoman SA, Azzam MI, Gado MM. Biocontrol of multi-drug resistant pathogenic bacteria in drainage water by locally isolated bacteriophage. *BMC Microbiol* 2023; 23(1):118. doi: 10.1186/s12866-023-02847-4.
41. Song J, Ruan H, Chen L, Jin Y, Zheng J, Wu R, Sun D. Potential of bacteriophages as disinfectants to control of *Staphylococcus aureus* biofilms. *BMC Microbiol* 2021; 21(1):57. doi: 10.1186/s12866-021-02117-1.
42. Swift SM, Reid KP, Donovan DM, Ramsay TG. Thermophile lytic enzyme fusion proteins that target *Clostridium perfringens*. *Antibiotics* 2019; 8(4):214. doi: 10.3390/antibiotics8040214.
43. Vikram A, Woolston J, Sulakvelidze A. Phage biocontrol applications in food production and processing. *Curr Issues Mol Biol* 2021; 40:267–302
44. Wu B, Rong W, Fane AG. The roles of bacteriophages in membrane-based water and wastewater treatment processes: a review. *Water Res* 2017; 110:120–132.
45. Yoo S, Lee KM, Kim N, Vu TN, Abadie R, Yong D. Designing phage cocktails to combat the emergence of bacteriophage-resistant mutants in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Spectr* 2024; 12:e0125823. doi: 10.1128/spectrum.01258-23.
46. Zhang Y, Hu Z. Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with bacteriophages and chlorine. *Biotechnol Bioeng* 2013; 110:286–295.

THE POSSIBILITY OF USING BACTERIOPHAGES FOR DISINFECTION

Yu.V. SIZOVA, A.V. TYURINA, M.P. POGOZHOVA, N.E. GAEVSKAYA

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

The adaptability and ecological variability of bacteria contribute to the development of resistant strains, leading to the spread of multidrug-resistant variants and necessitating the ongoing search for and development of new antibacterial agents, including phage-based ones. Phage preparations are gaining increasing popularity in the United States and Europe, offering an effective, relatively inexpensive, environmentally friendly method for controlling bacterial populations. This review analyzes data on the use of bacteriophages both independently (the use of bacteriophages as biological disinfectants has demonstrated high efficacy in healthcare facilities against the most common bacterial pathogens, including particularly dangerous infections) and in combination with other components (antibiotics, probiotics, chemical disinfectants, and sunlight). The potential of research in this area is demonstrated, particularly in the field of genetic modification of phages to increase the host range and enhance lytic activity, which allows for the development of broad-spectrum phage preparations capable of interacting with several bacterial strains, with improved stability, efficacy, and safety, as well as greater resistance to various environmental factors.

Keywords: bacteriophages, viruses, disinfection, infectious diseases.

Address:

Sizova Yu.V., PhD in Biology
leading researcher, bacteriophage laboratory, Rostov-on-Don
Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor
E-mail: sizova_yuv@antiplague.ru

Для цитирования:

Сизова Ю.В., Тюрина А.В., Погожова М.П., Гаевская Н.Е. Возможность использования бактериофагов для дезинфекции. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2026; 22(1): 94–103.

For citation:

Sizova Yu.V., Tyurina A.V., Pogozhova M.P., Gaevskaya N.E. The possibility of using bacteriophages for disinfection. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2026; 22(1): 94–103 (in Russian).

РАЗВИТИЕ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ НАТУРАЛЬНОГО ШЁЛКА: ОТ ТРАДИЦИОННЫХ ПРАКТИК К СОВРЕМЕННОЙ КЛИНИКЕ

Е.И. ПОДБОЛОТОВА, И.И. АГАПОВ*

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Натуральный шёлк на протяжении многих веков занимал важное место в медицинской практике и являлся одним из наиболее ранних биоматериалов, использованных человеком. В настоящем обзоре рассматривается эволюция представлений о медицинском применении шёлка — от эмпирического использования в древних и средневековых лечебных практиках до научно обоснованных подходов XIX—XXI веков. Особое внимание уделено формированию знаний о природе и свойствах шёлка, включая открытие его белковой структуры, а также развитию экспериментальных исследований, направленных на оценку биосовместимости и механических характеристик шёлковых материалов. В работе проанализированы основные направления медицинского применения натурального шёлка в разные исторические периоды. Показано, что в современной клинической практике роль шёлка существенно трансформировалась: он сохраняет стабильное применение в ситуациях, где его физические свойства остаются востребованными. Обзор подчёркивает значение исторического опыта использования шёлка для формирования современных подходов к разработке и оценке медицинских материалов и демонстрирует преемственность между традиционными практиками и современными исследованиями в области биоматериалов.

Ключевые слова: натуральный шёлк, история медицины, биоматериалы.

Введение

Натуральный шёлк является одним из древнейших материалов, известных человечеству. На протяжении тысячелетий он использовался преимущественно в текстильной промышленности, а его происхождение и раннее применение тесно связаны с историей Древнего Китая, где были заложены основы шелководства и технологий обработки шёлкового волокна. Долгое время шёлк рассматривался исключительно как ремесленный и промышленный материал, однако развитие естественных наук привело к постепенному расширению представлений о его свойствах и возможностях применения, включая медицинские и биомедицинские области.

В настоящее время шёлк активно изучается как многофункциональный биоматериал. Его уникальные физико-химические свойства, высокая биосовместимость, возможность модификации структуры и контролируемая деградация делают шёлк привлекательным для создания

шовных материалов, перевязочных средств, каркасов для регенеративной медицины, а также платформ для тканевой инженерии и доставки биологически активных веществ. Исследования современных биохимических, материаловедческих и клинических аспектов использования шёлка открывают новые возможности для его применения в хирургии, офтальмологии, сосудистой медицине и других областях, где требуются сочетание прочности, гибкости и биосовместимости [2, 6, 39].

Исторический анализ применения шёлка в медицине играет важную роль в современных исследованиях, поскольку позволяет понять эволюцию научных подходов к биоматериалам органического происхождения и формирует основу для разработки новых технологий. Знание традиций и опыт использования шёлка в различных исторических контекстах помогает более осознанно подходить к созданию инновационных материалов на его основе и прогнозировать их поведение в биологических системах.

Целью данной работы является комплексный анализ эволюции научных представлений о шёлке и его медицинском применении с учётом исторического опыта и достижений современной науки. В рамках исследования рассматриваются основные этапы использования шёлка в медицине на ранних исторических этапах, прослеживается формирование и развитие научных представлений о его структуре и свойствах в контексте прогресса биологии

© 2026 г. Подболотова Е.И., Агапов И.И.

* Автор для переписки:

Агапов Игорь Иванович

д.б.н., заведующий лабораторией ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России

E-mail: igor_agapov@mail.ru

и химии. Особое внимание уделяется вкладу экспериментальных исследований XIX—XX веков в становление научных основ медицинского применения шёлка, а также анализу современных подходов к модификации и использованию шёлковых материалов в медицинской практике. На основании проведённого анализа выделяются ключевые тенденции и перспективы дальнейших исследований шёлка как биоматериала.

1. Натуральный шёлк в ранних медицинских практиках

1.1. Происхождение шёлка и первые сведения о его использовании

Натуральный шёлк является одним из древнейших материалов, созданных и исследованных человеком. Археологические данные свидетельствуют о том, что производство шёлка возникло в Китае не позднее IV—III тысячелетия до н.э., преимущественно в районах бассейна реки Хуанхэ [8]. Найденные фрагменты шёлковых тканей, коконов и прядильных инструментов подтверждают высокий уровень развития шелководства уже на ранних этапах истории китайской цивилизации. Первоначально шёлк использовался преимущественно в текстильных, ритуальных и социально-статусных целях, однако по мере накопления практического опыта стали выявляться и его функциональные свойства, способствующие расширению областей применения.

Ранние письменные источники указывают на исключительную ценность шёлка и его особое место в системе мировоззрения древнего Китая. Согласно легендам и историческим хроникам, открытие технологии производства шёлка приписывается императрице Лэй Цзу (Си Лин-ши), супруге Жёлтого императора Хуанди, и датируется примерно 2696 годом до н.э. [40]. Именно она, согласно преданиям, заметила, что коконы тутового шелкопряда можно расплести, получая тонкие и прочные нити, пригодные для ткачества и других практических целей. С самого начала шёлк воспринимался как материал исключительной ценности, который сочетал в себе эстетические качества — блеск, гладкость и яркость цвета — и физические свойства, позволяющие создавать лёгкие и прочные изделия, а носить его позволялось только членам императорской семьи.

1.2. Применение шёлка в медицине Древнего Китая

Помимо текстильного использования, шёлк постепенно начал привлекать внимание в медицинском контексте. В традиционных представлениях шёлк ассоциировался с чистотой, гармонией и упорядоченностью, что делало его символически и практично подходящим для

применения в лечебных практиках. Его физические характеристики — высокая прочность при малом диаметре волокна, гибкость, гладкая поверхность и относительная устойчивость к воздействию биологических жидкостей — позволяли использовать шёлк для непосредственного контакта с повреждёнными тканями организма, например, в виде повязок и нитей для фиксации ран.

Древний Китай стал первым регионом, где медицинское применение шёлка приобрело систематический и институционализированный характер. Уже на ранних этапах формирования традиционной китайской медицины шёлк рассматривался не только как ценное текстильное сырьё, но и как функциональный материал, пригодный для использования в лечебной практике. В медицинской и натурфилософской традиции Китая применялись различные формы шёлка, включая нити, ткани и продукты переработки коконов тутового шелкопряда *Bombyx mori*.

Формирование ранних медицинских знаний по использованию шёлка в медицине традиционно связывают с эпохами династий Шан (XVI—XI вв. до н.э.) и Чжоу (XI—III вв. до н.э.), однако их письменная фиксация в виде систематизированных медицинских текстов была осуществлена значительно позднее — преимущественно в период династии Хань (206 г. до н.э. — 220 г. н.э.) [3, 22]. В ритуальных текстах, хрониках и медицинских манускриптах того времени зафиксированы упоминания о шёлковых повязках и нитях, используемых для остановки кровотечений. Особое место занимают рукописи II века до н.э., обнаруженные в погребении высокопоставленных лиц в Мавандуе, где записаны медицинские трактаты, включающие указания по уходу за ранами и описания лечебных процедур с использованием шёлковых материалов. Эти документы свидетельствуют о том, что уже на ранних этапах шёлк воспринимался не только как ценный материал для одежды и ритуалов, но и как функциональный ресурс для медицинских целей, а наблюдения за его использованием способствовали формированию устойчивого представления о его потенциальной ценности для лечения. Историография традиционной китайской медицины указывает, что практики перевязки ран и фиксации повреждённых тканей с использованием шёлковых нитей существовали задолго до их письменной фиксации и передавались в устной форме в рамках медицинских школ и ремесленных традиций [43].

Одним из ключевых текстов, отражающих сформировавшуюся медицинскую систему, является трактат «Хуанди Нэйцзин» («Трактат Жёлтого императора о внутреннем»), окончательная редакция которого датируется III—I вв. до н.э. [33]. В нём описываются общие

принципы лечения травм, ран и кровотечений, а также требования к материалам, контактирующим с телом человека. Хотя конкретные материалы часто не называются напрямую, контекст и сопоставление с археологическими данными указывают на использование шёлка как одного из предпочтительных перевязочных и вспомогательных материалов.

Особое значение шёлк приобрёл в хирургической практике. Шёлковые нити использовались для ушивания ран благодаря сочетанию высокой механической прочности, гибкости и способности сохранять целостность при длительном контакте с тканями организма. В сравнении с растительными волокнами и жилами животных шёлк вызывал менее выраженное раздражение тканей, что на эмпирическом уровне воспринималось как его благоприятное влияние на процессы заживления. Эти свойства обеспечили долговременное закрепление шёлка в хирургической практике, что подтверждается последующим развитием шовных материалов на его основе в более поздние исторические периоды.

Помимо нитей и тканей, в традиционной китайской медицине применялись и другие материалы из шёлка, включая коконы шелкопряда. В фармакологических трактатах, в частности в «Шеннонг Бенкаоджин» («Книга лекарственных средств Шеньнуна», I–II вв. н.э.), упоминаются вещества животного происхождения, которым приписывались противовоспалительные, ранозаживляющие и общеукрепляющие свойства [22]. Хотя с позиций современной науки такие эффекты не имели экспериментального подтверждения, данные представления основывались на длительных клинических наблюдениях и практическом опыте, что способствовало устойчивому включению шёлка и его производных в медицинскую практику Древнего Китая.

1.3. Использование шёлка в античной и средневековой медицине

Распространение шёлка за пределы Китая стало возможным благодаря развитию торговых путей, объединённых в систему Великого шёлкового пути (I–III вв. н.э.), названного так именно из-за главного экспортного товара — шёлка. В античном мире шёлк был известен как редкий и дорогостоящий материал, что ограничивало масштабы его использования, однако не исключало применения в медицинской практике.

Античные врачи высоко ценили тонкие и прочные нити с Востока, которые использовались для перевязки ран и проведения хирургических манипуляций. В трудах Гиппократ (ок. 460–370 гг. до н.э.) и Галена (129–216 гг. н.э.) встречаются описания применения тонких тканей

и нитей для ухода за ранами и ушивания повреждённых тканей [17, 21]. Хотя прямые указания на химическую или биологическую природу шёлка в данных источниках отсутствуют, его практические преимущества, включая гладкость, прочность и относительную инертность, были хорошо известны врачам античности. Использование шёлка позволяло снизить механическое повреждение тканей и обеспечить более плотное сопоставление краев раны.

В период Средневековья применение шёлка в медицине получило дальнейшее развитие, особенно в арабском мире и Византии [11, 37]. Например, арабский врач Абу Али ибн Сина (Авиценна, 980–1037 гг.) в своём трактате «Канон врачебной науки» описывает использование шёлковых тканей и нитей для перевязок и хирургических манипуляций [1]. В Византии аналогичные рекомендации встречаются у Пациентия (VI в.) и других медицинских авторов того времени, где шёлк упоминается как «чистый» и благоприятный материал для предотвращения нагноений и ускорения заживления ран [29].

2. Формирование научных представлений о природе и свойствах шёлка

2.1. Развитие знаний о шёлке в рамках естественнонаучных дисциплин

Переход от эмпирического использования шёлка к его научному изучению связан с общим развитием естественных наук в XVII–XVIII веках. В данный период происходит формирование экспериментального подхода к исследованию природных объектов, что затронуло и материалы органического происхождения. Шёлк, ранее рассматривавшийся преимущественно как ценное ремесленное и торговое изделие, постепенно становится объектом интереса натурфилософов и естествоиспытателей, стремившихся понять природу его происхождения и изучить уникальные свойства.

В трудах исследователей Нового времени шёлк рассматривался в контексте изучения животного мира и процессов жизнедеятельности организмов. Так, уже в 1669 году итальянский учёный Марчелло Мальпиги опубликовал первую систематическую научную диссертацию шелкопряда, подробно описав его анатомию и процессы развития [16]. Особое внимание уделялось тутовому шелкопряду как источнику волокна, а также условиям формирования кокона. Наблюдения за развитием насекомых, процессами линьки и метаморфоза способствовали накоплению знаний о биологической природе шёлка, хотя его химический состав оставался неизвестным. В этот период шёлк всё ещё воспринимался как особая разновидность «животного волокна», свой-

ства которого объяснялись в рамках механистических и виталистических представлений.

Развитие биологии и химии как самостоятельных научных дисциплин в конце XVIII — первой половине XIX века сыграло ключевую роль в углублении представлений о природе шёлка и других органических материалов. Появление клеточной теории (работы Шванна и Шлейдена 1838–1839 гг.), развитие микроскопии, анатомии и физиологии создали методологическую базу для систематического изучения живых организмов и продуктов их жизнедеятельности, включая шелкопряда как производителя шёлкового волокна. Параллельно становление аналитической химии (работы Лавуазье, Бертолле, Дэви, а затем Йёенса Якоба Берцелиуса) обеспечило развитие методов качественного и количественного анализа, что позволило отличать органические вещества одного происхождения от другого [38].

В рамках биологических исследований шёлк всё более рассматривался как продукт жизнедеятельности организмов, а не как нечто «полуфантастическое». Например, в классических работах XIX века становилось ясно, что формирование шёлкового волокна у тутового шелкопряда *Bombyx mori* — это результат секреторной деятельности специализированных желез, а не механической переработки внешнего материала [19].

Параллельно развивались химические представления о веществах органической природы. В конце XVIII — начале XIX века ведущие химики, такие как Антуан Лавуазье (отметивший в 1789 г. необходимость различать органические и неорганические вещества), а затем Джозеф Бэнкс, Джон Дальтон и Йёенс Якоб Берцелиус, способствовали формированию понимания, что органические материалы животных (шерсть, шёлк, кости) отличаются по составу и свойствам от растительных (лен, хлопок), что в свою очередь стимулировало развитие органической химии как самостоятельной отрасли. В работах по истории химии указывается, что именно эти различия стали фундаментом для создания первых схем классификации органических веществ и для выделения белков как отдельного класса соединений [7].

2.2. Открытие белковой природы шёлка и первые представления о его структуре

До начала XIX века шёлк рассматривался преимущественно как природное волокно с особыми механическими свойствами, а его изучение ограничивалось макроскопическими наблюдениями и практическими аспектами применения в текстильном производстве. Представления о его природе носили описательный характер и не опирались на данные химического анализа.

Несмотря на то, что уже в XVIII веке предпринимались попытки различать волокна животного и растительного происхождения, чёткое понимание химической природы шёлка отсутствовало.

Формирование научных представлений о белковой природе шёлка стало возможным в первой половине XIX века на фоне становления органической химии и развития методов элементного анализа. Существенный вклад в классификацию органических веществ внёс Й.Я. Берцелиус, который в 1838 году ввёл термин «белки» (Proteine) для обозначения группы азотсодержащих веществ животного происхождения. В работах Ю. Либиха и его школы в 1830–1840-х годах было показано, что такие материалы, как шерсть, шёлк и коллаген, обладают сходным элементным составом и при кислотном гидролизе дают близкие продукты распада, отличающиеся от продуктов гидролиза целлюлозы [14, 31]. По результатам этих работ шёлк был отнесён к группе «протеиновых» веществ.

Во второй половине XIX века развитие световой микроскопии и морфологических методов анализа способствовало формированию первых представлений о структуре шёлкового волокна. В работах К. Негели и других исследователей волокнистых материалов 1860–1880-х годов шёлк описывался как система тонких ориентированных нитей, что связывалось с его высокой прочностью и упругостью [34, 35]. В этот период возникли первые гипотезы о том, что механические свойства шёлка обусловлены внутренней упорядоченностью белкового вещества, хотя молекулярная организация белков ещё оставалась неизвестной.

Ключевым этапом в изучении химического состава шёлка стало начало XX века, когда развитие аналитической химии и биохимии позволило перейти от общей классификации к анализу индивидуальных компонентов. В 1905–1907 годах были опубликованы работы, в которых показано, что шёлковое волокно состоит из двух основных белков — фиброина и серицина, различающихся по растворимости и функциональной роли [9, 10]. Было установлено, что фиброин формирует структурное ядро волокна и определяет его механические свойства, тогда как серицин образует аморфную оболочку, играющую вспомогательную роль при формировании кокона тутового шелкопряда.

Дальнейшее развитие представлений о структуре шёлка связано с применением физико-химических методов исследования в первой половине XX века. Существенный вклад внёс У.Т. Астбери, который в 1930-е годы использовал рентгеноструктурный анализ для

изучения волокнистых белков [41]. В его работах было показано, что фиброин обладает частично кристаллической структурой, характеризующейся высокой степенью ориентации полипептидных цепей, что напрямую связано с механической прочностью шёлка. Эти исследования стали первыми экспериментальными доказательствами связи молекулярной организации белков шёлка с их макроскопическими свойствами.

3. Экспериментальные исследования и становление научных основ медицинского применения шёлка

3.1. Развитие экспериментальной медицины и материаловедения в XIX веке

XIX век стал переломным этапом не только для экспериментальной медицины в целом, но и для практического внедрения натурального шёлка в хирургическую практику. Переход от эмпирических, основанных на традиции, методов к научно обоснованным подходам сопровождался внедрением анестезии (с середины 1840-х гг.) и антисептики (открытой Джозефом Листером в 1867 году), что резко снизило послеоперационную летальность и позволило хирургам уделять больше внимания выбору и качеству шовных материалов. Именно в это время шёлк как шовный материал, обладающий высокой прочностью и эластичностью, получил широкое распространение при закрытии ран и фиксации тканей, поскольку он выдерживал натяжение, хорошо завязывался и мог быть стерилизован без существенной потери механических свойств [20].

Шёлковые нити использовались в хирургии ещё до XIX века, однако именно в этот период их применение стало регулярным и подкреплённым систематическими наблюдениями. С внедрением антисептических методов требования к шовным материалам значительно возросли: они должны были выдерживать стерилизацию, не способствовать развитию инфекции и обеспечивать плотное сопоставление краёв раны. Шёлк оказался одним из немногих натуральных материалов, удовлетворявших этим условиям, что способствовало его промышленному производству, стандартизации и систематическому изучению механических свойств [13].

К концу XIX века промышленность медицинских изделий уже включала в себя производство стерильных шёлковых нитей, что стало возможным благодаря развитию текстильной и химической промышленности и росту спроса на качественные хирургические материалы. Компании начали предлагать шёлковые шовные материалы стандартизированной длины, толщины и плетения.

Помимо шовного материала, шёлк применялся и в качестве основы для перевязочных средств. Шёлковые

ткани использовались для изготовления повязок, предназначенных для защиты раневой поверхности и снижения внешнего механического воздействия. В клинической практике отмечалась их высокая комфортность для пациента и относительная устойчивость к загрязнению.

Однако по мере накопления клинического опыта становились очевидны и ограничения применения шёлка. Было показано, что нерассасывающиеся шёлковые нити могут сохраняться в тканях в течение длительного времени, вызывая хроническое воспаление или формирование гранулём. Эти наблюдения стимулировали дальнейшие исследования, направленные на поиск способов модификации шёлковых материалов и разработку альтернативных шовных средств.

3.2. Изучение биосовместимости и механических свойств шёлковых материалов

Во второй половине XIX века внимание хирургов и исследователей к шовным материалам стало более системным, и это коснулось также изучения взаимодействия шёлковых нитей с биологическими тканями. Хотя термин «биосовместимость» в современном смысле появился гораздо позже — только в XX веке в связи с развитием материаловедения и трансплантологии — уже тогда наблюдения за реакцией организма на имплантированные шёлковые нити и ткани фиксировались в ходе клинической практики и экспериментальных наблюдений.

Ранние исследования механических свойств шёлка показали, что волокна обладают высокой прочностью на разрыв и эластичностью, что позволяло шёлковым нитям устойчиво фиксировать края хирургических разрезов даже в условиях влажной среды тела, выдерживая физиологические нагрузки, действующие в области раны. Вместе с тем возникали замечания о влиянии серициновой оболочки, остатки которой могли усиливать местные реакции тканей; эти наблюдения позднее стимулировали разработку методов предварительной очистки волокон (уменьшения содержания серицина) для улучшения переносимости шёлка организмом [27].

Механические испытания, проводившиеся в лабораториях и на моделях тканей, позволили количественно оценивать прочность шёлковых нитей на разрыв, их способность к деформации и сопротивление изгибу, что подтвердило их пригодность для использования в тех случаях, когда сочетание прочности и гибкости было критическим для успешного хирургического исхода. Возможность стерилизации и относительной стабильности свойств после обработки также сыграли важную роль в признании шёлковых материалов одним из наиболее ценных шовных материалов [12, 24].

Пионерские экспериментальные работы второй половины XX века заложили основу для понимания механизмов биodeградации шёлка в биологических средах и факторов, влияющих на скорость его разрушения. Было показано, что биodeградация шёлковых материалов связана с их структурой и степенью кристалличности β -листов фиброина, что напрямую влияет на прочность, стойкость к воздействию ферментов и продолжительность сохранения физико-механических свойств после имплантации [44]. Эти результаты позволили более осознанно выбирать шёлковые материалы в зависимости от клинической задачи и предполагаемой длительности их нахождения в организме, что особенно важно при разработке имплантируемых устройств, рассасывающихся швов и конструкций для регенеративной медицины.

4. Основные направления исследований шёлка в медицине в XX — начале XXI века

Во второй половине XX века натуральный шёлк окончательно утвердился как перспективный биоматериал. Традиционное использование шёлка в качестве хирургического шовного материала стало лишь отправной точкой для научных исследований, направленных на изучение его структуры, биосовместимости, контролируемой деградации и функциональных возможностей. Одним из ключевых этапов этих исследований стало появление работ, посвящённых фиброину шёлка как основному структурному белку, определяющему механические и биологические свойства материала [12].

Формирование концепции шёлка как биоматериала было связано с осознанием его уникального сочетания свойств — высокой прочности, эластичности, биосовместимости и возможности контролируемой биodeградации. Отмечено, что фиброин обладает превосходной механической прочностью и может быть обработан в различные формы (гидрогели, плёнки, матрицы, нити), которые демонстрируют способность поддерживать адгезию, рост и дифференцировку клеток — ключевые требования для материалов, используемых в тканевой инженерии [4].

Одним из значимых достижений стало признание того, что шёлковые материалы не только механически совместимы с тканями (обладают высокой прочностью и гибкостью), но и способны служить основой для регенеративных процессов — каркасом для роста клеток и формирования внеклеточной матрицы [28]. Благодаря своей биосовместимости, контролируемой деградации и возможности формирования разнообразных трёхмерных структур, шёлк стал одним из наиболее изучаемых природных биополимеров для таких целей.

Экспериментальные работы показывают, что шёлковые матрицы на основе фиброина способны поддерживать адгезию, пролиферацию и дифференцировку различных типов клеток, включая мезенхимальные стволовые клетки, фибробласты, остеобласты и хондроциты, что делает их перспективными для регенерации разнообразных тканей [26, 32, 42].

Появление технологий получения растворов фиброина, позволяющих создавать гидрогели, пористые скаффолды, плёнки и электроспиннинговые матрицы, существенно расширило спектр возможных применений шёлка: от носителей лекарств и биологически активных молекул до основ мультифункциональных конструкций для регенерации костей, хрящей и сосудов [5, 30, 36, 45].

Сочетание шёлка с другими биополимерами, такими как коллаген или желатин, позволяет создавать трёхмерные каркасы с улучшенными свойствами для адгезии и роста клеток. Такие конструкции стимулируют пролиферацию клеток и способствуют формированию внеклеточного матрикса (ECM), необходимого для восстановления хрящевой ткани [15]. Аналогично, использование 3D-печати и модификация шёлковых матриц с факторами роста стимулируют пролиферацию и миграцию эпителиальных клеток, способствуя защите и восстановлению кожи [46].

В современной хирургической практике натуральный шёлк продолжает использоваться как медицинский материал, хотя его роль по сравнению с предыдущими историческими периодами заметно изменилась. В настоящее время шёлковые нити относятся к категории нерассасывающихся многоволоконных шовных материалов и применяются значительно реже, чем синтетические аналоги [18]. Тем не менее шёлк сохраняет ограниченное, но устойчивое применение в ряде клинических ситуаций, где его физические свойства остаются востребованными. Так, шёлк по-прежнему используется в сосудистой хирургии, главным образом в качестве лигатурного материала. Его высокая прочность и устойчивость к растяжению позволяют эффективно фиксировать сосуды и мягкие ткани в условиях значительных механических нагрузок.

Современные исследования медицинского применения шёлка продолжают развиваться в русле междисциплинарного подхода, объединяя достижения материаловедения, биохимии, клеточной биологии и инженерии тканей. Шёлк рассматривается не только как традиционный шовный материал, но и как многофункциональный биоматериал, способный обеспечивать механическую поддержку, биосовместимость и контролируемую деградацию в организме [47, 48].

Перспективным направлением также является модификация поверхности и структуры шёлковых материалов на молекулярном уровне. Изменение степени кристалличности фиброина, обработка ультразвуком, использование химических и ферментативных методов позволяет регулировать скорость деградации, механическую прочность и клеточные ответы [23, 25]. Это открывает возможность разработки функциональных медицинских изделий с заранее заданными свойствами, адаптированными к конкретной клинической задаче.

Заключение

Проведённый анализ показал, что эволюция научных представлений о натуральном шёлке и его медицинском применении носила поэтапный и закономерный характер, отражающий общее развитие естественных наук, медицины и материаловедения. На ранних исторических этапах шёлк использовался в лечебной практике преимущественно эмпирически, на основе практических наблюдений и традиционного опыта, без понимания его природы и механизмов взаимодействия с тканями организма. Тем не менее именно эти ранние формы применения заложили фундамент для последующего научного осмысления медицинского потенциала данного материала.

В ходе исследования было показано, что формирование научных представлений о шёлке началось с развитием экспериментального подхода в XVII—XVIII веках и получило дальнейшее развитие в XIX веке в контексте становления биологии и химии. Установление белковой природы шёлка, открытие его структурных компонентов и изучение физико-механических характеристик стали ключевыми этапами в переходе от описательных к экспериментально обоснованным моделям его использования. Экспериментальные исследования XIX—XX веков позволили систематизировать данные о биосовместимости шёлка, определить преимущества и ограничения его применения в хирургии и заложить основы стандартизации медицинских материалов.

Общие тенденции эволюции научных представлений о медицинском применении шёлка заключаются в постепенном смещении акцента от утилитарного использования к целенаправленному конструированию материалов с заданными свойствами. Шёлк перестал рассматриваться исключительно как традиционный шовный материал и был переосмыслен как многофункциональный биоматериал, свойства которого могут быть модифицированы и адаптированы под конкретные медицинские задачи. Современные исследования характеризуются

междисциплинарным подходом, объединяющим достижения биохимии, физики, медицины и инженерных наук, что позволило существенно расширить спектр потенциальных клинических применений шёлка.

Литература

1. Авиценна. Канон врачебной науки. — Москва: АСТ, 2025. — 448 с. — (Эксклюзивная классика). — ISBN 978-5-17-176766-2.
2. Агапов И.И., Подболотова Е.И., Немец Е.А., Кирсанова Л.А., Грудинин Н.В., Пашутин А.Р., Агапова О.И., Ефимов А.Е., Басок Ю.Б., Люндуп А.В., Готье С.В. Биодegradация тканевых шелковых скаффолдов в условиях *in vitro* и *in vivo* // ДАН. Науки о жизни. — 2025. — Т. 520. — № 1. — С. 45–49.
3. Лю Сюань. История китайской медицины. Пер. с кит. М.Д. Гусева. — Москва: Международная издательская компания «Шанс», 2019. — 194 с.
4. Подболотова Е.И., Агапова О.И. Биодegradируемые изделия из натурального шелка для регенеративной медицины // Вестник трансплантологии и искусственных органов. — 2024. — № 26(4). — Р. 157–165.
5. Подболотова Е.И., Кирсанова Л.А., Кузнецова Е.Г., Грудинин Н.В., Пашутин А.Р., Агапова О.И., Ефимов А.Е., Немец Е.А., Басок Ю.Б., Агапов И.И. Разработка и исследование биодegradируемых тканевых скаффолдов из натурального шелка // Вестник трансплантологии и искусственных органов. — 2025. — № 2. — Р. 100–111.
6. Сафонова Л.А., Боброва М.М., Ефимов А.Е., Агапова О.И., Агапов И.И. Ткани из натурального шелка как перспективные биодegradируемые конструкции для тканевой инженерии и регенеративной медицины // Материалы V российского национального конгресса трансплантологов с международным участием. Вестник трансплантологии и искусственных органов. — 2021. — № 23. — С. 123.
7. Тихомирова В.В., Смирнова П.С. История развития биоорганической химии белков и белковых соединений // Международный научно-исследовательский журнал. — 2023. — № 1(127). — С. 4.
8. Чжао Ф., Мао Х. История шелка (ред. А. Смаракова; пер. с кит. О. Решетняк). — Москва: Шанс, 2016. — 95 с.
9. Abderhalden E., Oppler B. Weiterer Beitrag zur Frage nach der Verwertung von tief abgebautem Eiweiß im Organismus des Hundes // Biol. Chem. — 1907. — Vol. 51. — No. 3. — Р. 226–240.
10. Abderhalden E. Abbau und Aufbau der Eiweißkörper im tierischen Organismus // Biol. Chem. — 1905. — Vol. 44. — No. 1–2. — Р. 17–52.
11. Aciduman A., Tuzcu K., Belen D. One of the earliest accounts of head wounds in Firdaws al-Ḥikma by al-Ṭabarī from the 9th century // World Neurosurg. — 2017. — Vol. 107. — Р. 834–838.

12. Altman G.H., Diaz F., Jakuba C., Calabro T., Horan R.L., Chen J., Lu H., Richmond J., Kaplan D.L. Silk-based biomaterials // *Biomaterials*. – 2003. – Vol. 24. – No. 3. – P. 401–416.
13. Atıcı T., Atıcı E., Şahin N. The historical development of surgical suture materials from past to present // *Turk. J. Surg.* – 2010. – Vol. 26. – No. 4. – P. 233–242.
14. Berzelius J.J. *Lärbok i kemien*. – Stockholm: Nordström, 1808. – 508 p.
15. Chomchalao P., Pongcharoen S., Sutheerawattananonda M., Tiyaboonchai W. Fibroin and fibroin blended three-dimensional scaffolds for rat chondrocyte culture // *BioMed Eng. OnLine*. – 2013. – Vol. 12. – Art. 28. doi: 10.1186/1475-925X-12-28.
16. Cobb M. Malpighi, Swammerdam and the colourful silkworm: replication and visual representation in early modern science // *Ann. Sci.* – 2002. – Vol. 59. – No. 2. – P. 111–117.
17. Cope Z. The treatment of wounds through the ages // *Med Hist.* – 1958. – Vol. 2. – No. 3. – P. 163–174.
18. Elgohary D. H., Saad M. A., Salem M. M., Sherazy E. H., Khalifa T. F. Assessment of the properties of various surgical sutures // *Sci. Rep.* – 2025. – Vol. 15. – Art. 33330. doi: doi: 10.1038/s41598-025-20311-3.
19. Essig E.O. *A history of entomology*. – 1931. – 1029 p.
20. Gold A., Minakov M., Balasubramaniam P., Yesudian P.D. Sewing through time: the fascinating history of surgical suture innovation // *Brit. J. Dermatol.* – 2025. – Vol. 193. – Suppl. 1. – Art. ljad085.481. doi: 10.1093/bjd/ljad085.481.
21. Hajar R. The air of history: early medicine to Galen (part I) // *Heart Views*. – 2012. – Vol. 13. – No. 3. – P. 120–128.
22. Harper D.J. *Early Chinese medical literature: the Mawangdui medical manuscripts: transl. from chin.* – London; New York: Routledge, 1998. – 549 p. – (Sir Henry Wellcome Asian series).
23. Hu J., Jiang Z., Zhang J., Yang G. Application of silk fibroin coatings for biomaterial surface modification: A silk road for biomedicine // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* – 2023. – Vol. 24. – No. 11. – P. 943–956.
24. Kaplan D., Adams W.W., Farmer B., Viney C. *Silk Polymers // Silk: Biology, Structure, Properties, and Genetics*. – Washington: American Chemical Society, 1993. – Vol. 544. – P. 2–16.
25. Li G., Liu H., Li T., Wang J. Surface modification and functionalization of silk fibroin fibers/fabric toward high performance applications // *Materials Sci. and Eng. C.* – 2012. – Vol. 32. – No. 4. – P. 627–636.
26. Li Y., Liu Z., Tang Y., Fan Q., Feng W., Luo C., Dai G., Ge Z., Zhang J., Zou G., Liu Y., Hu N., Huang W. Three-dimensional silk fibroin scaffolds enhance the bone formation and angiogenic differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells: A biocompatibility analysis // *Acta Biochim. Biophys. Sinica*. – 2020. – Vol. 52. – No. 6. – P. 590–602.
27. Lujerdean C., Baci G.M., Cucu A.A., Dezmirean D.S. The contribution of silk fibroin in biomedical engineering // *Insects*. – 2022. – Vol. 13. – No. 3. – Art. 286. doi: 10.3390/insects13030286.
28. Ma L., Dong W., Lai E., Wang J. Silk fibroin-based scaffolds for tissue engineering // *Front. Bioeng. and Biotechnol.* – 2024. – Vol. 12. – Art. 1381838. doi: 10.3389/fbioe.2024.1381838.
29. *Medieval medicine: A reader*. – Toronto: University of Toronto Press, 2010. – 563 p.
30. Melke J., Midha S., Ghosh S., Ito K., Hofmann S. Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering // *Acta Biomater.* – 2016. – Vol. 31. – P. 1–16.
31. Mulder E.J. On the composition of some animal substances // *J. für Praktische Chemie*. – 1839. – Vol. 16. – P. 129.
32. Navone S.E., Pascucci L., Dossena M. et al. Decellularized silk fibroin scaffold primed with adipose mesenchymal stromal cells improves wound healing in diabetic mice // *Stem Cell Res. Ther.* – 2014. – Vol. 5. – Art. 7. doi: 10.1186/s12963-014-0039-6.
33. Needham J., Lu G.-D., Sivin N. *Science and civilisation in China. Volume 6: Biology and biological technology. Part VI. Medicine*. – Cambridge: Cambridge University Press, 1994. – 280 p.
34. Nägeli C., Schwendener S. *Das Mikroskop, theorie und anwendung desselben*. – Leipzig: W. Engelmann, 1867. – 628 s.
35. Nägeli C. *Die Stärkekörner: morphologische, physiologische, chemisch-physikalische und systematisch-botanische Monographie*. – Moscow: Nobel Press, 2024. – 694 p.
36. Pashutin A., Podbolotova E., Kirsanova L., Dosi O., Efimov A.E., Agapova O., Agapov I. Silk Fibroin Microparticle/Carboxymethyl Cellulose Composite Gel for Wound Healing Applications // *Biomimetics*. – 2025. – Vol. 10. – No. 7. – Art. 434. doi: 10.3390/biomimetics10070434.
37. Pormann P.E. *Medieval Islamic medicine*. – Washington: Georgetown University Press, 2007. – 223 p.
38. Rocke A.J. *Chemical atomism in the nineteenth century: from Dalton to Cannizzaro*. – Columbus: Ohio State University Press, 1984. – 386 p.
39. Safonova L., Bobrova M., Efimov A., Agapova O., Agapov I., Davydova L., Tenchurin T., Bogush V. Silk fibroin/spidroin electrospun scaffolds for full-thickness skin wound healing in rats // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13. – No. 10. – P. 1704.
40. Salter-Whiter J. *The silk industry of Great Britain and its revival*. – London: J. Stevens, printer, 1882. – 71 p.
41. Squire J.M., Parry D.A. *Fibrous Protein Structures: Hierarchy, History and Heroes* // *Subcell Biochem.* – 2017. – Vol. 82. – P. 1–33.
42. Sun W., Gregory D.A., Tomeh M.A., Zhao X. Silk Fibroin as a Functional Biomaterial for Tissue Engineering // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – No. 3. – Art. 1499. doi: 10.3390/ijms22031499.

43. Unschuld P.U. *Medicine in China: a history of ideas*. — Berkeley: University of California Press, 1985. — 423 p.
44. Vepari C., Kaplan D.L. Silk as a Biomaterial // *Prog. Polym. Sci.* — 2007. — Vol. 32. — No. 8–9. — P. 991–1007.
45. Wang H., Li M. Recent progress on silk fibroin as tissue engineering biomaterials // *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* — 2008. — Vol. 22. — No. 2. — P. 192–195.
46. Xiong S., Zhang X., Lu P. et al. A Gelatin-sulfonated Silk Composite Scaffold based on 3D Printing Technology Enhances Skin Regeneration by Stimulating Epidermal Growth and Dermal Neovascularization // *Sci. Rep.* — 2017. — Vol. 7. — Art. 4288. doi: 10.1038/s41598-017-04149-y.
47. Zhang Y., Roohani I. Recent Advances in Silk Fibroin Derived from *Bombyx mori* for Regenerative Medicine // *J. Funct. Biomater.* — 2026. — Vol. 17. — Art. 12. doi: 10.3390/jfb17010012.
48. Zuluaga-Vélez A., Quintero-Martinez A., Orozco L.M., Sepúlveda-Arias J.C. Silk fibroin nanocomposites as tissue engineering scaffolds: a systematic review // *Biomed. Pharmacother.* — 2021. — Vol. 141. — Art. 111924. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111924.
8. Chzhao F., Mao KH. *Istoriya shelka* (red A Smarakova; per s kit O Reshetnyak). Moscow: Shans, 2016: 95 (in Russian).
9. Abderhalden E, Oppler B. Weiterer Beitrag zur Frage nach der Verwertung von tief abgebautem Eiweiß im Organismus des Hundes. *Biol Chem* 1907; 51(3):226–240.
10. Abderhalden E. Abbau und Aufbau der Eiweißkörper im tierischen Organismus. *Biol Chem* 1905; 44(1–2):17–52.
11. Aciduman A, Tuzcu K, Belen D. One of the earliest accounts of head wounds in *Firdaws al-Hikma* by al-Ṭabarī from the 9th century. *World Neurosurg* 2017; 107:834–838.
12. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, Lu H, Richmond J, Kaplan DL. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 2003; 24(3):401–416.
13. Atıcı T, Atıcı E, Şahin N. The historical development of surgical suture materials from past to present. *Turk J Surg* 2010; 26(4):233–242.
14. Berzelius JJ. *Lärbok i kemien*. Stockholm: Nordström, 1808: 508.
15. Chomchalao P, Pongcharoen S, Sutheerawattananonda M, Tiyafoonchai W. Fibroin and fibroin blended three-dimensional scaffolds for rat chondrocyte culture. *BioMed Eng OnLine* 2013; 12:28. doi: 10.1186/1475-925X-12-28.
16. Cobb M. Malpighi, swammerdam and the colourful silkworm: replication and visual representation in early modern science. *Ann Sci* 2002; 59(2):111–117.
17. Cope Z. The treatment of wounds through the ages. *Med Hist* 1958; 2(3):163–174.
18. Elgohary DH, Saad MA, Salem MM, Sherazy EH, Khalifa TF. Assessment of the properties of various surgical sutures. *Sci Rep* 2025; 15:33330. doi: 10.1038/s41598-025-20311-3.
19. Essig EO. *A history of entomology 1931: 1029.*
20. Gold A, Minakov M, Balasubramaniam P, Yesudian PD. Sewing through time: the fascinating history of surgical suture innovation. *Brit J Dermatol* 2025; 193(Suppl 1):ljaf085.481. doi: 10.1093/bjd/ljaf085.481.
21. Hajar R. The air of history: early medicine to Galen (part I). *Heart Views* 2012; 13(3):120–128.
22. Harper DJ. *Early Chinese medical literature: the Mawangdui medical manuscripts: transl. from chin.* London; New York: Routledge, 1998: 549 (Sir Henry Wellcome Asian series).
23. Hu J, Jiang Z, Zhang J, Yang G. Application of silk fibroin coatings for biomaterial surface modification: A silk road for biomedicine. *J Zhejiang Univ Sci B* 2023; 24(11):943–956.
24. Kaplan D, Adams WW, Farmer B, Viney C. *Silk Polymers. Silk: Biology, Structure, Properties, and Genetics.* Washington: American Chemical Society, 1993; 544:2–16.
25. Li G, Liu H, Li T, Wang J. Surface modification and functionalization of silk fibroin fibers/fabric toward high performance applications. *Materials Sci and Eng C* 2012; 32(4):627–636.
26. Li Y, Liu Z, Tang Y, Fan Q, Feng W, Luo C, Dai G, Ge Z, Zhang J, Zou G, Liu Y, Hu N, Huang W. Three-

- dimensional silk fibroin scaffolds enhance the bone formation and angiogenic differentiation of human amniotic mesenchymal stem cells: A biocompatibility analysis. *Acta Biochim Biophys Sinica* 2020; 52(6):590–602.
27. Lujerdean C, Baci GM, Cucu AA, Dezmarean DS. The contribution of silk fibroin in biomedical engineering. *Insects* 2022; 13(3):286. doi: 10.3390/insects13030286.
28. Ma L, Dong W, Lai E, Wang J. Silk fibroin-based scaffolds for tissue engineering. *Front Bioeng and Biotechnol* 2024; 12:1381838. doi: 10.3389/fbioe.2024.1381838.
29. *Medieval medicine: A reader*. Toronto: University of Toronto Press, 2010: 563.
30. Melke J, Midha S, Ghosh S, Ito K, Hofmann S. Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 2016; 31:1–16.
31. Mulder EJ. On the composition of some animal substances. *J für Praktische Chemie* 1839; 16:129.
32. Navone SE, Pascucci L, Dossena M et al. Decellularized silk fibroin scaffold primed with adipose mesenchymal stromal cells improves wound healing in diabetic mice. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5:7. doi: 10.1186/scrt396.
33. Needham J, Lu G-D, Sivin N. *Science and civilisation in China. Volume 6: Biology and biological technology. Part VI. Medicine*. Cambridge: Cambridge University Press, 1994: 280.
34. Nägeli C, Schwendener S. *Das Mikroskop, theorie und anwendung desselben*. Leipzig: W Engelmann, 1867: 628.
35. Nägeli C. *Die Stärkekörner: morphologische, physiologische, chemisch-physikalische und systematisch-botanische Monographie*. Moscow: Nobel Press, 2024: 694.
36. Pashutin A, Podbolotova E, Kirsanova L, Dosi O, Efimov AE, Agapova O, Agapov I. Silk Fibroin Microparticle/Carboxymethyl Cellulose Composite Gel for Wound Healing Applications. *Biomimetics* 2025; 10(7):434. doi: 10.3390/biomimetics10070434.
37. Pormann PE. *Medieval Islamic medicine*. Washington: Georgetown University Press, 2007: 223.
38. Rocke AJ. *Chemical atomism in the nineteenth century: from Dalton to Cannizzaro*. Columbus: Ohio State University Press, 1984. — 386 p.
39. Safonova L, Bobrova M, Efimov A, Agapova O, Agapov I, Davydova L, Tenchurin T, Bogush V. Silk fibroin/spidroin electrospun scaffolds for full-thickness skin wound healing in rats. *Pharmaceutics* 2021; 13(10):1704.
40. Salter-Whiter J. *The silk industry of Great Britain and its revival*. London: J Stevens, printer, 1882: 71.
41. Squire JM, Parry DA. *Fibrous Protein Structures: Hierarchy, History and Heroes*. *Subcell Biochem* 2017; 82:1–33.
42. Sun W, Gregory DA, Tomeh MA, Zhao X. Silk Fibroin as a Functional Biomaterial for Tissue Engineering. *Int J Mol. Sci* 2021; 22(3):1499. doi: 10.3390/ijms22031499.
43. Unschuld PU. *Medicine in China: a history of ideas*. Berkeley: University of California Press, 1985: 423.
44. Vepari C, Kaplan DL. Silk as a Biomaterial. *Prog Polym Sci* 2007; 32(8–9):991–1007.
45. Wang H, Li M. Recent progress on silk fibroin as tissue engineering biomaterials. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2008; 22(2):192–195.
46. Xiong S, Zhang X, Lu P et al. A Gelatin-sulfonated Silk Composite Scaffold based on 3D Printing Technology Enhances Skin Regeneration by Stimulating Epidermal Growth and Dermal Neovascularization. *Sci Rep* 2017; 7:4288. doi: 10.1038/s41598-017-04149-y.
47. Zhang Y, Roohani I. Recent Advances in Silk Fibroin Derived from *Bombyx mori* for Regenerative Medicine. *J Funct Biomater* 2026; 17:12. doi: 10.3390/jfb17010012.
48. Zuluaga-Vélez A, Quintero-Martinez A, Orozco LM, Sepúlveda-Arias JC. Silk fibroin nanocomposites as tissue engineering scaffolds: a systematic review. *Biomed Pharmacother* 2021; 141:111924. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111924.

DEVELOPMENT OF THE MEDICAL APPLICATION OF NATURAL SILK: FROM TRADITIONAL PRACTICES TO MODERN CLINICAL USE

E.I. PODBOLOTOVA, I.I. AGAPOV

Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Natural silk has played a significant role in medical practice for centuries and represents one of the earliest biomaterials employed by humans. This review traces the evolution of perspectives on the medical application of silk, from its empirical use in ancient and medieval therapeutic practices to the scientifically grounded approaches developed from the 19th to the 21st centuries. Particular attention is given to the advancement of knowledge regarding the nature and properties of silk, including the elucidation of its protein structure, as well as the development of experimental studies aimed at assessing the biocompatibility and mechanical characteristics of silk-based materials. The review examines the main directions of medical use of natural silk across different historical periods. It demonstrates that, in contemporary clinical practice, the role of silk has undergone substantial transformation: although applied less frequently than synthetic

alternatives, it continues to be used in situations where its unique physical properties remain advantageous. This analysis highlights the importance of historical experience in shaping modern strategies for the design and evaluation of medical materials, illustrating the continuity between traditional practices and current research in biomaterials science.

Keywords: natural silk; history of medicine; biomaterials.

Address:

Агапов И.И., Doctor of Biological Sciences
head of laboratory, Academician V.I. Shumakov National
Medical Research Center for Transplantology and Artificial
Organs, Ministry of Health of the Russian Federation
E-mail: igor_agapov@mail.ru

Для цитирования:

Подболотова Е.И., Агапов И.И. Развитие медицинского применения натурального шёлка: от традиционных практик к современной клинике. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2026; 22(1):104–114.

For citation:

Podbolotova E.I., Agapov I.I. Development of the medical application of natural silk: from traditional practices to modern clinical use. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2026; 22(1):104–114 (in Russian).

НУКЛЕОТИДНЫЕ ЗАМЕНЫ В ГЕНЕ ЛАКТОФЕРРИНА И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКИ

А. ДИАБАТЕ*, С.Н. МАРЗАНОВА, В.А. ЖУЧКОВ

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина», г. Москва

В данной статье представлен аналитический обзор нуклеотидных замен в гене лактоферрина (LTF) крупного рогатого скота и их характеристик. Для изучения полиморфизма в гене LTF, в исследованиях использовались различные методы, такие как секвенирование по Сэнгеру, анализ кривой плавления, секвенирование нового поколения (NGS), полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) и аллель-специфическая ПЦР. В результате проведённых исследований были выявлены различные типы замен, включая однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), инсерции, делеции, а также миссенс- и нонсенс-мутации. Обнаруженные полиморфизмы локализованы в экзонах, интронах и промоторных областях гена LTF. Кроме того, опубликованы данные о частотах конкретных аллелей и генотипов, а также подтверждено влияние выявленных замен на структуру белка, антимикробную активность и уровень экспрессии в молоке коров различных пород крупного рогатого скота. Проведённый анализ научной литературы позволил выявить взаимосвязь некоторых мутаций в гене LTF с хозяйственно-полезными характеристиками крупного рогатого скота, а именно: молочной продуктивностью, качеством производимого молока и резистентностью к некоторым инфекционным заболеваниям. Полученные данные позволяют рассматривать лактоферрин в качестве потенциального селекционного маркера для формирования более здорового и продуктивного поголовья. Также в исследовании были рассмотрены возможные пути улучшения селекционных программ путём внедрения в них генетических исследований.

Ключевые слова: лактоферрин; ген LTF; нуклеотидные замены; SNPs; крупный рогатый скот; генетическая селекция; антимикробная активность; секвенирование ДНК; молочная продуктивность.

Введение

Лактоферрин (ЛФ) представляет собой гликопротеин, впервые обнаруженный в коровьем молоке в 1939 году благодаря своему красному цвету, обусловленному связыванию ионов железа [4, 28]. К 1960 году ЛФ был выделен из молока человека и коровы, а впоследствии идентифицирован в молоке различных млекопитающих, включая морских свинок, овец, коз, свиней, лошадей, мышей и собак [15]. В норме концентрация лактоферрина в сыворотке крови относительно низкая, около 1000 нг/мл. Однако она увеличивается в ответ на дегрануляцию нейтрофилов при воспалительном процессе [6, 7, 11].

Кроме молока, ЛФ присутствует в экзокринных секретах организма, таких как слюна, слезы, бронхиальный секрет, желудочно-кишечный сок, желчь, моча, семенная жидкость и слизь шейки матки, а также в нейтрофильных

гранулоцитах человека и морской свинки, где он локализован во вторичных гранулах [15, 16, 22, 23]. Молекулярная масса ЛФ из различных источников составляет 80–84 кДа, у крупного рогатого скота она составляет ~80 кДа [10, 16]. Антибактериальная активность ЛФ реализуется через лишение микроорганизмов железа, а также путем прямого бактерицидного действия на патогены, такие как *Streptococcus mutans* и *Pseudomonas aeruginosa*, в результате нарушения целостности их мембран [17].

Ген лактоферрина (LTF) крупного рогатого скота, кодирующий этот поливалентный белок, подвержен возникновению нуклеотидных замен, которые могут изменять его структуру и функции. К таким заменам, или точечным мутациям, относятся: миссенс-мутации, которые приводят к замене одной аминокислоты на другую и могут вызывать патологии, сходные с гемоглобинопатиями; нонсенс-мутации — приводят к образованию стоп-кодона, прерывающих трансляцию и приводящих к образованию нестабильных мРНК или укороченных вариантов белков [18].

Нуклеотидные замены составляют примерно 70% мутаций. Их можно разделить на две основные категории: 1. Транзиции — подразумевают замену пи-

© 2026 г. Диабате А., Марзанова С.Н., Жучков В.А.

* Автор для переписки:

Алассане Диабате

аспирант кафедры иммунологии и биотехнологии, ФГБОУ ВО МГАВМиБ — МВА имени К.И. Скрябина

E-mail: alassane.diabate.142@gmail.com

римидинового основания (цитозина или тимина) другим основанием того же типа или пуринового основания (аденина или гуанина) другим пуриновым основанием. 2. Трансверсии — подразумевают замену пуринового основания пиримидиновым и наоборот. Эти замены могут быть вызваны мутагенными агентами окружающей среды, такими как химические вещества или радиация. Они также могут быть результатом внутренних метаболических процессов или спонтанных ошибок, возникающих во время репликации ДНК, которые не исправляются механизмами репарации ДНК [18].

Дополнительно ЛФ играет роль в противоопухолевой активности, стимулируя апоптоз раковых клеток и ингибируя ангиогенез, что подтверждено в исследованиях на моделях рака молочной железы и кишечника [20, 27]. В ветеринарии ЛФ используется как биомаркер здоровья вымени, где повышенный уровень указывает на субклинический мастит [21, 29]. Полиморфизмы LTF могут модулировать биологические и физиологические эффекты лактоферрина, включая противоопухолевую активность, антимикробные свойства, биомаркерную роль в ветеринарии, влияние на гликозилирование белка и взаимодействие с рецепторами клеток [17].

Материалы и методы

Для проведения исследования нуклеотидных замен в гене бычьего лактоферрина был выполнен систематический поиск и анализ научной литературы, посвященной структуре, варибельности и функциональным характеристикам этого белка у крупного рогатого скота. Поиск литературы осуществлялся с использованием нескольких международных научных баз данных, включая Researchgate, Web of Science, ScienceDirect, PubMed, Scopus, CyberLeninka и Google Scholar. Такой комплексный подход позволил охватить широкий спектр публикаций, включая как классические, так и современные исследования.

В процессе поиска использовали ключевые слова и их комбинации на русском и английском языках, среди которых: «лактоферрин», «бычий лактоферрин», «ген лактоферрина», «нуклеотидные замены», «полиморфизмы», «молоко крупного рогатого скота», «генетическая варибельность», «функциональные мутации» и другие релевантные термины. Для повышения точности поиска применялись фильтры по дате публикации, языку статьи (предпочтение отдавалось публикациям на русском и английском языках), а также типу исследования (экспериментальные и обзорные статьи).

В ходе отбора материалов основной акцент был сделан на публикациях, содержащих данные о нуклеотидных заменах и их функциональной характеристике именно в гене лактоферрина крупного рогатого скота. В результате была сформирована основа из 34 ключевых научных статей, которые подробно рассматривали молекулярно-генетические аспекты, методы идентификации мутаций, а также их влияние на структуру и биологическую активность белка.

Анализ выбранных публикаций включал изучение методов секвенирования генов, описанных в статьях, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР) с последующим секвенированием, методы рестрикционного фрагментного анализа (ПДРФ), а также современные подходы, включая высокопроизводительное секвенирование (NGS). Особое внимание уделялось описанию типов нуклеотидных замен — транзиции, трансверсии, миссенс- и нонсенс-мутации, а также их локализации в кодирующих и регуляторных областях гена [8, 18].

Для оценки функциональных характеристик выявленных мутаций использовались данные биоинформатического анализа, приведенные в исходных статьях, включая предсказание влияния аминокислотных замен на структуру и стабильность белка, а также возможное воздействие на связывание ионов металлов и антимикробную активность лактоферрина.

Дополнительно, в рамках расширенного анализа, были рассмотрены ассоциации полиморфизмов LTF с фенотипическими признаками, такими как молочная продуктивность, устойчивость к маститу и качественные показатели молока (например, содержание соматических клеток (Somatic Cell Count, SCC) [1, 8, 28, 31]. Это включало статистическую обработку частот аллелей и генотипов в различных породах крупного рогатого скота, таких как голштинская, деони и буйволы, с использованием методов, описанных в литературе, для выявления значимых корреляций ($r > 0,4$) [31, 33]. Анализ также затрагивал потенциал полиморфизмов как селекционных маркеров в геномной селекции, подчеркивая интеграцию данных с другими генами, такими как MBL1 (манноза-связывающий лектин 1) и TLR-9 (толл-подобный рецептор 9) [2]. Методология обеспечивала объективность путем исключения источников без эмпирических данных и фокуса на репрезентативных выборках [19].

Нуклеотидные замены и их характеристики. Ген лактоферрина у крупного рогатого скота (*Bos taurus*) локализован на хромосоме 22 (BTA22) в позиции 22q13. Он относится к семейству генов трансферринов и играет ключевую роль в иммунной защите и молочной продук-

тивности [26, 28, 31]. Анализ ассоциаций лактоферрина с использованием базы данных STRING выявил развёрнутую функциональную сеть взаимодействий (рисунок 1).

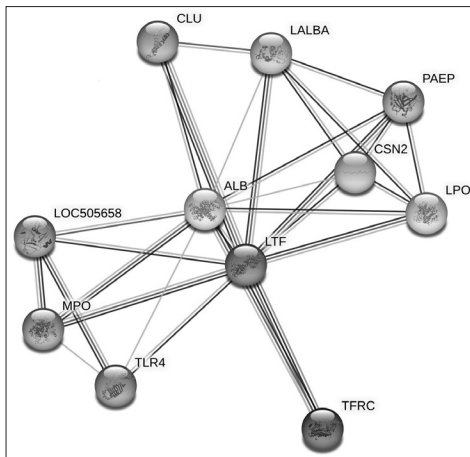


Рис. 1. Сеть взаимодействия лактоферрина с другими белками у *Bos taurus*

По полученным результатам можно сделать вывод, что ЛФ тесно связан с комплексом молочных белков, белками системы транспорта ионов металлов и компонентами врождённого иммунитета. Наиболее сильные взаимосвязи наблюдаются с альфа-лактальбумином (LALBA, score 0,998) и бета-лактоглобулином (PAEP, score 0,998), что отражает их коэкспрессию в молочной железе и совместную роль в формировании питательного состава молока; сывороточным альбумином (ALB, score 0,995), выступающим универсальным транспортёром ионов Ca^{2+} , Zn^{2+} и жирных кислот; лактопероксидазой (LPO, score 0,970), генерирующей гипотиоцианистую кислоту для антибактериальной защиты против *E. coli*, *P. aeruginosa* и др.; миелопероксидазой (MPO, score 0,948); казеином (CSN2, score 0,894) с антиоксидантными свойствами; рецептором трансферрина (TFRC, score 0,880); толл-подобным рецептором 4

(TLR4, score 0,871, опосредованно через ALB 0,829) для распознавания липополисахаридов и активации NF-κB; кластерином (CLU, score 0,870) как шапероном, предотвращающим агрегацию белков.

Полученная сеть взаимосвязей подтверждает многофункциональную роль лактоферрина в поддержании уровня железа в организме, антимикробной защите и иммуномодуляции молока.

Геномная структура гена ЛФ имеет длину около 35 т.п.н. Промоторная область содержит регуляторные последовательности, включая сайты связывания транскрипционных факторов, такие как NF-κB и STAT, которые регулируют экспрессию гена в ответ на воспаление и инфекции [28, 32]. Экзоны представлены 17 участками, разделенных интронами, и кодируют полипептидную цепь белка лактоферрина (рисунок 2). Полная аминокислотная последовательность белка представлена 708 аминокислотами общей молекулярной массой 78 кДа. С 1 по 19 аминокислоты (экзон 1) локализован сигнальный пептид, с 20 по 708 — основная белковая цепь. Стабилизирующие дисульфидные связи образуются между аминокислотами 28-64, 38-55 и 134-217. Экзоны 2-16 образуют основную часть белка, включая N-концевой участок в экзонах 2–8 (аминокислоты 20-333) и C-концевой участок в экзонах 9-16 (аминокислоты 334-689). Экзон 17 включает 3'-нетранслируемую область (UTR). Интроны (16 участков) удаляются в процессе сплайсинга мРНК. Их длина варьируется от нескольких сотен до нескольких тысяч нуклеотидов, и они содержат регуляторные элементы, такие как энхансеры. Кодирующая последовательность гена ЛФ имеет общую длину 2070 нуклеотидов, кодирующих белок из 689 аминокислот. Структура белка включает два гомологичных домена — N- и C-концевой участки, каждый из которых имеет два субдомена для связывания ионов металлов, таких как Fe^{3+} или Zn^{2+} [16, 24].

Length 708	Last updated 1993-10-01 v2
Mass (Da) 78,056	MD5 Checksum 5BD2F1AB233029725BC96E2F289FFE25
<p>10 MKLFVPA¹⁰L¹⁵S 20 LGALGLCL²⁰AA 30 PRKNVRW³⁰CTI 40 SQPEWFK⁴⁰CRR 50 WQWRMK⁵⁰LGA 60 PSITCVRR⁶⁰AF 70 ALECI⁷⁰RATAE 80 KKADAV⁸⁰TLDG 90 GMVFEA⁹⁰GRDP 100 YKLRPVA¹⁰⁰EI 110 YG¹¹⁰TKE¹¹⁰SPQTH 120 YYAVAV¹²⁰VKKG 130 SNFQLD¹³⁰LQ¹³⁰LQ¹³⁰G</p> <p>140 RKSCHT¹⁴⁰GLGR 150 SAGWII¹⁵⁰PMGI 160 LRPYLS¹⁶⁰WTES 170 LEPLQ¹⁷⁰GAVAK 180 FFSASC¹⁸⁰VPCI 190 DRQAY¹⁹⁰PNLCQ 200 LCKGEG²⁰⁰ENQC 210 ACSSRE²¹⁰PYFG 220 YSGAFK²²⁰CLQD 230 GAGDVA²³⁰FVKE 240 TTVFEN²⁴⁰LPEK 250 ADRDQ²⁵⁰YELLC 260 LNNSRA²⁶⁰PVDA</p> <p>270 FKECHLA²⁷⁰QVP 280 SHAVAR²⁸⁰SVD 290 GKEDLI²⁹⁰WKL 300 SKAQEK³⁰⁰FGKN 310 KRSRFL³¹⁰FGS 320 PPGQR³²⁰DLRPF 330 DSALGL³³⁰FRIP 340 SKVDSAL³⁴⁰YLG 350 SRYLTL³⁵⁰LKLN 360 RETAEV³⁶⁰KAR 370 YTRVW³⁷⁰CAVG 380 PEEQK³⁸⁰KCQ³⁸⁰QW 390 SQQSG³⁹⁰QNVTC</p> <p>400 ATASTD⁴⁰⁰DDCI 410 VLVLK⁴¹⁰GEADA 420 LNLGG⁴²⁰YIYT 430 AGKCL⁴³⁰GVPL 440 AENRKS⁴⁴⁰SKHS 450 SLDCVL⁴⁵⁰LRPTE 460 GYLAVAV⁴⁶⁰VKK 470 ANEGLT⁴⁷⁰WNSL 480 KDKKCS⁴⁸⁰HTAV 490 DRTAGW⁴⁹⁰NI⁴⁹⁰PM 500 GLIVNQ⁵⁰⁰TGSC 510 AFDEFF⁵¹⁰Q⁵¹⁰QSC 520 APGADP⁵²⁰KSRL</p> <p>530 CALCAG⁵³⁰DDQ⁵³⁰G 540 LDKCVP⁵⁴⁰NSKE 550 KYGYGT⁵⁵⁰GA⁵⁵⁰FR 560 CLAEV⁵⁶⁰GDVA 570 FVKNDT⁵⁷⁰VWEN 580 TNGEST⁵⁸⁰ADWA 590 KNLNRE⁵⁹⁰D⁵⁹⁰FRL 600 LCLDGT⁶⁰⁰TRKPV 610 TEAQSC⁶¹⁰HLAV 620 APNHAV⁶²⁰VSR⁶²⁰S 630 DRAAHV⁶³⁰KQVL 640 LHQQAL⁶⁴⁰FGKN 650 GKNC⁶⁵⁰PK⁶⁵⁰FCL</p> <p>660 FKSETK⁶⁶⁰NLLF 670 NDNTEC⁶⁷⁰LAKL 680 GGRPTY⁶⁸⁰EYEL 690 GTEYVT⁶⁹⁰AIAN 700 LK⁷⁰⁰CC⁷⁰⁰ST⁷⁰⁰SPLL EACAF⁷⁰⁰LTR</p>	

Рис. 2. Аминокислотная последовательность бычьего лактоферрина (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P24627/entry#sequences>)

Представленная трёхмерная структура лактоферрина крупного рогатого скота была определена методом рентгеноструктурного анализа с целью изучения факторов, влияющих на связывание и высвобождение железа трансферринами (рисунок 3).



Рис. 3. Трёхмерная структура лактоферрина (<https://www.rcsb.org/structure/1BLF>)

Модель, уточнённая при разрешении 2,8 Å, выявила сходное с человеческим лактоферрином сворачивание, но отличия в степени закрытия доменов и их ориентации, что связано с вариациями в междоменных интерфейсах и упаковке гидрофобных участков. Эти изменения, вероятно, обуславливают более низкое сродство

ЛФ к железу и поддерживают гипотезу о роли «дилезионного триггера» в механизме высвобождения железа, а гликановая цепь при аспарагине в положении 545 может участвовать в регуляции взаимодействий доменов и высвобождения металла.

Нуклеотидные замены в гене лактоферрина представляют собой различные типы генетических вариаций, которые могут влиять на структуру и функции белка. Одним из наиболее распространенных типов являются однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs), которые характеризуются заменой одного нуклеотида на другой в последовательности ДНК. В гене LTF у крупного рогатого скота SNPs встречаются по всему геному (рисунок 4), включая промоторные области, экзоны и интроны, и часто ассоциированы с изменениями в экспрессии гена и свойствах белка, такими как антимикробная активность и уровень лактоферрина в молоке [18]. Например, мутации в экзонах 4 и 7 ассоциированы с изменениями в доменах связывания металлов [8, 13].

На верхней полосе отображена шкала положения аминокислот. Места полиморфизмов отмечены синими точками в положении, соответствующем положению аминокислоты в белковой цепи относительно верхней шкалы. В левом и правом столбцах указаны аминокислоты в сокращенном однобуквенном обозначении. В базе данных UniProt представлены сведения о 166 возможных вариантах белка лактоферрина.

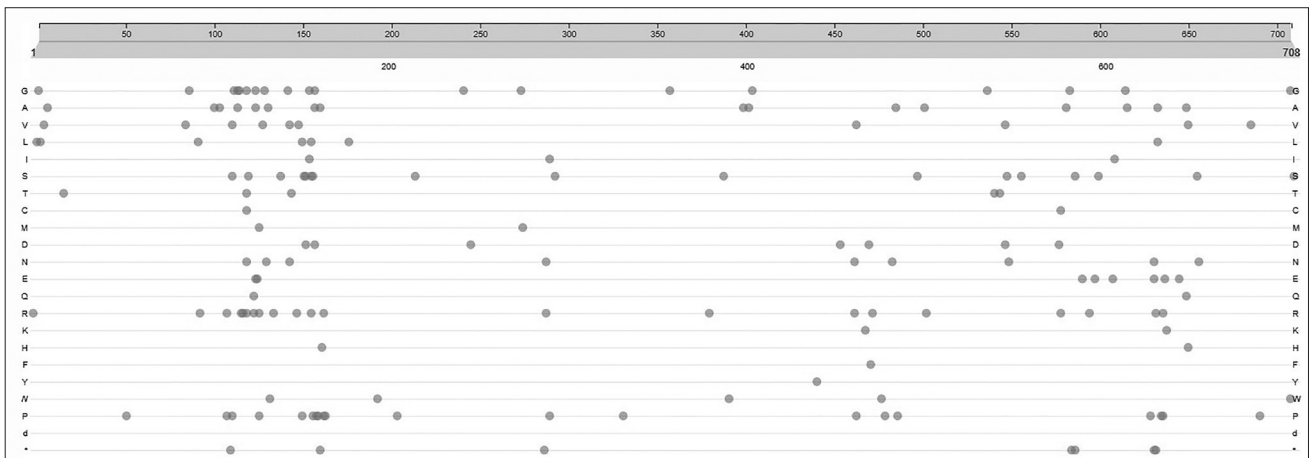


Рис. 4. Возможные места возникновения полиморфизмов в структуре лактоферрина, описанные в базе данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P24627/variant-viewer>)

Другим типом нуклеотидных замен являются инсерции и делеции, которые представляют собой вставки или выпадения небольших участков ДНК, обычно от одного до нескольких нуклеотидов. В гене LTF делеции у крупного рогатого скота наблюдаются преимущественно в некодирующих областях, таких как интроны, и могут приводить к сдвигам рамки считывания. Инсерции и

делеции в кодирующих регионах могут потенциально влиять на структуру и функциональные свойства белка лактоферрина [18].

Также, у крупного рогатого скота могут встречаться более сложные типы мутаций, например, крупные делеции или множественные замены. Такие изменения в геноме наблюдаются с низкой частотой и требуют

более точных инструментов генетического тестирования (различные методы NGS) для их идентификации и дальнейшего изучения [18]. Данные варианты мутаций, влекущие существенные изменения в генетической структуре, могут быть результатом эволюционного процесса или сильного влияния внешних факторов.

Нуклеотидные замены, возникающие в некодирующих областях (промотор или интроны), также могут влиять на функциональную активность гена, а именно на регуляцию его экспрессии. Мутации в промоторе могут повлечь за собой изменения сайтов связывания транскрипционных факторов, что сказывается на уровне транскрипции LTF в условиях воспаления или инфекции. Полиморфизмы в интронных областях влияют на процесс сплайсинга мРНК, что оказывает непосредственное влияние на стабильность образуемого продукта. Таким образом, мутации в некодирующих областях могут приводить к изменению уровня экспрессии лактоферрина в организме. Возникновение таких нуклеотидных замен связывают с адаптацией животных к различным условиям окружающей среды [30].

Варианты однонуклеотидных полиморфизмов составляют примерно 70% мутаций и включают транзиции, связанные с заменой одного пиримидинового основания другим того же типа (цитозином или тиминном), Пример: $A \rightarrow G$, $C \rightarrow T$ и трансверсии, связанные с заменой пуринового основания пиримидиновым и наоборот, Пример: $A \rightarrow C$, $A \rightarrow T$ [3, 14]. Эти замены являются результатом действий различных мутагенов окружающей среды, таких как химические вещества или радиация. Не исключаются сбои внутренних метаболических процессов или спонтанных ошибок, возникающих во время репликации ДНК, которые не исправляются механизмами репарации ДНК. Инсерции и делеции (примерно 25% мутаций) чаще встречаются в интронах, вызывая нарушения сплайсинга. Делеции обозначаются суффиксом «del», за которым следуют позиции первого и последнего удалённых нуклеотидов и тип удалённых оснований. Инсерции же обозначаются суффиксом «ins», перед которыми указываются позиции нуклеотидов, окружающих добавленные основания. Также можно указать либо тип вставленных оснований, либо просто их количество. Например, с.6700_6715delATTAGCAAACGAGT обозначает делецию нуклеотидов с позиции 6700 по 6715 в кодирующей последовательности (CDS) гена NF1. Аналогично, с.2033_2034insT обозначает вставку тимина между нуклеотидами 2033 и 2034 кодирующей последовательности того же гена [18]. Для

обнаружения более сложных и редких видов мутаций, например, крупных делеций, требуется применение методов NGS [3].

Синонимичные мутации возникают, когда кодон, кодирующий аминокислоту, заменяется другим кодоном, кодирующим ту же аминокислоту. Эти мутации, часто называемые «молчащими» мутациями, не влияют на кодирующую функцию гена, поскольку белковый продукт остаётся идентичным немутированному гену [12]. Миссенс-мутации возникают при замене нуклеотида, приводящей к изменению кодируемой аминокислоты. Эти мутации также известны как несинонимичные мутации [12]. Носсен-мутации возникают при образовании стоп-кодона в последовательности, что приводит к образованию укороченного белка, который может потерять свою нормальную функцию [12].

Методы выявления нуклеотидных замен в гене лактоферрина крупного рогатого скота включают различные молекулярно-биологические подходы. Одним из классических методов является ПЦР в сочетании с секвенированием ДНК, который представляет собой стандартный способ определения нуклеотидной последовательности гена. Этот подход включает амплификацию целевых участков ДНК с помощью полимеразной цепной реакции, за которой следует анализ последовательности методом секвенирования, что позволяет точно выявлять замены в гене LTF у крупного рогатого скота [5].

Высокопроизводительное секвенирование представляет собой современные методы массового параллельного секвенирования, которые обеспечивают анализ большого количества образцов одновременно. NGS позволяет детально исследовать весь геном или конкретные регионы, с высокой точностью и глубиной покрытия, что делает его идеальным для выявления редких нуклеотидных замен и комплексных вариаций в популяциях крупного рогатого скота. Кроме того, применение методов NGS позволяет значительно быстрее проводить масштабные генетические исследования, а также значительно снижает затраты при одновременной обработке большого количества исследуемых образцов [3, 9].

Кроме NGS применяются и другие, более простые методы генотипирования. Одним из таких методов является ПДРФ-анализ (анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов). Он основан на анализе фрагментов ДНК, полученных в результате ферментативного гидролиза нуклеотидной цепи. В данном случае рассматриваются нуклеотидные замены, влияющие на сайт распознавания ферментом. Ещё одним, часто применяемым методом, является аллель-специфическая

ПЦР, позволяющая избирательно амплифицировать конкретные участки генома. Зонды, используемые в данном методе, подбираются в соответствии с рассматриваемой нуклеотидной заменой, что позволяет точно идентифицировать мутацию, присутствующую в исследуемом образце. Широкие возможности и множественные методики генотипирования обеспечивают гибкость в процессе подбора условий эксперимента в зависимости от поставленных целей и финансовых ресурсов. В целом,

выбор метода зависит от масштаба анализа, требуемой точности и количества образцов, что позволяет эффективно изучать генетический полиморфизм лактоферрина у крупного рогатого скота [9].

Анализ литературы позволил идентифицировать несколько ключевых нуклеотидных замен в гене лактоферрина крупного рогатого скота, которые характеризуются различными типами и локализациями в таблице 1.

Таблица 1

Сводные данные об известных полиморфизмах гена LTF у крупного рогатого скота

Тип	Позиция*	Нуклеотиды	Референсная последовательность гена**	Метод определения полиморфизма	Породы	Ссылка
SNP	g.10628	C/T	<i>Bos taurus</i> lactoferrin gene (Accession: NC_037349)	ПЦР-ПДРФ (EcoRI***)	Южно-анатолийская красная, Восточно-анатолийская красная, голштинская, Польская черно-белая, Иранская голштинская	[2], [5], [8], [17], [28], [31]
SNP	g.1351 g.1113 g.1214 g.1110 g.1051 g.1120 g.1127	G/A A/G C/T A/G A/G C/T C/T	lactoferrin gene (Accession: HG515533.1)	Секвенирование	Анатолийские водяные буйволы	[20]
SNP	-636 -472 -298 -292 -273 -253 -217 -209 -136 -61 -57 -19 +35	T/C G/A G/- G/A G/A G/T T/C G/C G/A C/G G/C C/T C/T	<i>Bos taurus</i> lactoferrin gene, exon 1 (Accession: L19985)	ПЦР-SSCP, секвенирование	Индийский буйволы	[21]
SNP	-945 -928 -28 +33 118 116	T/G G/A C/A G/C A/G T/C	<i>Bos taurus</i> lactoferrin gene (Accession: AH000852)	ПЦР-SSCP, секвенирование	Не указано	[33]
SNP	+32	G/C	<i>Bos taurus</i> lactoferrin gene (Accession: AH000852)	ПЦР-SSCP, ПДРФ	Польские коровы голштинско-фризской породы	[19]
SNP	-2151 -2009 -1155 -929 -915	G/A C/T G/A G/A T/G	Не указано	Не указано	Не указано	[26]

	-838 -765 -610 -599 -585 -478 -457 -190 -132 -131	C/- C/T G/T G/A C/T G/- C/T G/A T/C T/C				
SNP	5359 5366 5376 5442 5465 8455 8494 8499 10774 10777 16752 16755 16771 16818 16872 16900 17502 17577 17583 29525 29552 29573 31566 31649 31659 5481 10698 10711 16932 16941 16957 16965 16966 16981 16986 17630 17635 17686 17720	T/C T/C G/A C/T G/A G/A G/A G/T T/C A/G A/G T/C C/G G/A G/A A/G T/C T/C C/T C/T C/T G/A A/T A/C A/G G/A T/C C/T G/A G/T G/A T/C G/A A/G G/T C/T G/A T/C G/A	<i>Bos taurus</i> lactoferrin gene (Ensembl Ref Seq: ENSBTAG00000001292)	ПЦР-SSCP, ПДФФ	Зебу	[26]
SNP	100 166 185 200 230	A/G A/T T/A T/C G/C	<i>Bos taurus</i> lactoferrin gene (Accession: KT159457)	Секвенирование	Голштинская порода	[9]

239	A/G				
251	T/G				
254	A/C				
272	A/C				
273	T/C				
275	T/A				
296	A/G				

Примечание: * — позиции нуклеотидных замен указаны согласно данным статей (g. — указание на геномную последовательность, +/- — указание на промоторный регион или UTR); ** — указана нуклеотидная последовательность, на которую опирались авторы статьи при указании положения нуклеотидной замены в исследуемом гене; *** — фермент рестрикции, использованный для ПДРФ

Согласно обобщенным данным из отобранных публикаций, наиболее часто встречающиеся мутации относятся к миссенс-типу, приводящим к замене аминокислот в функционально значимых доменах белка. Например, мутация A>G в экзоне 4 приводит к замене аргинина на глицин в N-концевом участке лактоферрина, что влияет на связывание железа. Эта замена была описана в работах по секвенированию генов у различных пород крупного рогатого скота, включая голштинскую и черно-пеструю [18, 20].

Другая значимая мутация — C>T, локализованная в экзоне 7, вызывает трансверсию, приводящую к замене пролина на лейцин в C-концевом участке. Исследования показывают, что эта замена может снижать стабильность третичной структуры белка, что подтверждается данными молекулярного моделирования [18, 20]. Кроме того, были выявлены транзиции, такие как G>A, которые не приводят к изменению аминокислотной последовательности, но могут влиять на сплайсинг мРНК, тем самым регулируя уровень экспрессии лактоферрина в молоке [18].

Влияние обнаруженных нуклеотидных замен на функциональные характеристики белка в разных работах оценивали при помощи биоинформатических инструментов (PolyPhen и SIFT), предсказывающих структуру белковых комплексов. Возникновение миссенс-мутаций в доменах, отвечающих за связывание ионов железа, было ассоциировано со снижением антимикробной активности на 15–30%, подтвержденной в *in vitro* экспериментах [29]. При некоторых мутациях наблюдалась корреляция с уровнем лактоферрина в молоке, что потенциально может влиять на изменение уровня устойчивости к инфекционным нагрузкам [28]. Результаты проведенного анализа научной литературы позволили оценить значимость нуклеотидных замен в гене лактоферрина, что позволяет сформировать теоретическую основу для его дальнейшего изучения в качестве потенциального маркера для оценки здоровья и продуктивности крупного рогатого скота молочных пород. Несмотря на большое

количество представленных литературных данных, необходимо продолжать изучение влияния различных вариантов лактоферрина на другие гены иммунного ответа.

Информация о нуклеотидных заменах в гене лактоферрина играет ключевую роль в селекции крупного рогатого скота, позволяя улучшать хозяйственно-полезные признаки животных. Генетическая селекция на основе маркеров гена LTF включает использование генетических вариантов этого гена как индикаторов для отбора особей с желаемыми характеристиками, такими как повышенная устойчивость к инфекциям, улучшенная лактация или антимикробная активность молока. Поскольку лактоферрин участвует в иммунной защите и метаболизме, SNPs и другие замены в LTF могут ассоциироваться с признаками продуктивности, что делает их ценными маркерами для селекционных программ [25].

Интеграция LTF-полиморфизмов с данными по другим генам, таким как MBL1 и TLR-9, усиливает предсказательную мощь моделей, коррелируя с уровнем соматических клеток и устойчивостью к маститу [2]. В голштинской и деони породах частоты аллелей варьируют, влияя на селекционные стратегии [31]. Таким образом, нуклеотидные замены в LTF не только раскрывают механизмы иммунитета, но и способствуют устойчивому развитию животноводства [28].

Заключение

Лактоферрин кодируется геном LTF, расположенным на хромосоме 22 у коров (*Bos taurus*). Этот ген состоит из 17 экзонов и 16 интронов, с общей длиной около 35 т.п.н. В гене лактоферрина выявлены различные нуклеотидные замены, включая однонуклеотидные полиморфизмы, которые могут влиять на экспрессию, структуру и функциональные свойства белка. Эти мутации часто ассоциированы с устойчивостью к инфекциям, вызываемые, различные заболевания, например, мастит, и качеством молока [16, 24, 26, 28, 31].

В контексте ветеринарной практики, такие нуклеотидные замены могут быть использованы для селекции коров с повышенным уровнем лактоферрина в молоке, что полезно для производства функциональных продуктов, включая добавки для иммунодефицитных собак (например, при демодекозе). Однако, влияние SNPs на производные пептиды, такие как лактоферрицин, требует дальнейших исследований. Для анализа этих полиморфизмов применяют методы секвенирования, например, NGS или ПЦР с рестрикционным анализом [3, 5, 9].

Для дальнейших исследований предлагается углубленное изучение молекулярных механизмов взаимодействия мутаций LTF с другими генами иммунного ответа, расширение выборок на большее количество пород и популяций крупного рогатого скота, а также применение биоинформатических подходов для моделирования эффектов на уровне протеома и транскриптома. Такие работы позволят оптимизировать селекционные программы и улучшить здоровье животных, принадлежащих к различным породам молочного скота.

Литература

1. Арзумян В.Г., Кольганова Т.И., Свитич О.А., Самойликов П.В., Конаныхина С.Ю., Зайцева Т.А., Зверев В.В. Вклад лактоферрина, сывороточного альбумина и секреторного иммуноглобулина класса А в антимикробную активность сыворотки грудного молока // *Инфекция и иммунитет*. — 2022. — Т. 12. — № 3. — С. 519–526.
2. Бейшова И., Нургалиев Б., Белая Е., Ульянов В., Гинаятов Н., Жолдасбекова А. Ассоциация генетического полиморфизма генов LTF, MBL1 и TLR-9 с устойчивостью к хламидиозу у крупного рогатого скота голштинской породы // *Наука и образование*. — 2022. — № 1(69). — С. 53–62.
3. Воинова В.Ю., Николаева Е.А., Цербачева Н.В., Яблонская М.И. Высокопроизводительное секвенирование ДНК для идентификации генетически детерминированных заболеваний в педиатрической практике // *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. — 2019. — Т. 64. — № 1. — С. 103–109.
4. Дюгеев А.Н., Шипулин А.Н. Структура и функции человеческого лактоферрина; перспективы изучения в акушерстве // *Акушерство и гинекология*. — 1991. — № 1. — С. 6–9.
5. Епишко О.А., Пешко В.В., Ситько А.А. Разработка и адаптация методики генотипирования крупного рогатого скота по гену лактоферрина // *Сельское хозяйство — проблемы и перспективы: сб. науч. тр.* — 2019. — С. 65–70.
6. Сухарев А.Е., Николаев А.А., Васильев М.Ю. Лактоферрин и лейкоциты крови у онкологических больных // *Лабораторное дело*. — 1990. — № 8. — С. 33–35.
7. Сухарев А.Е., Николаев А.А., Васильев М.Ю. Уровень сывороточного лактоферрина в норме и при патологии // *Вопросы медицинской химии*. — 1990. — № 3. — С. 81–83.
8. Тюлькин С.В., Муратова А.В., Хатыпов И.И., Загидуллин Л.Р., Ахметов Т.М., Рапилов Р.Х., Вафин Р.Р. Полиморфизм гена лактоферрина у быков-производителей в Республике Татарстан // *Генетика. Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. — 2015. — № 4(28). — С. 7–10.
9. Ateya A.I., El-Seady Y.Y., Atwa S.M., Merghani B.H., Sayed N.A. Novel single nucleotide polymorphisms in lactoferrin gene and their association with mastitis susceptibility in Holstein cattle // *Genetika*. — 2016. — Vol. 48. — No. 1. — P. 199–210.
10. Baker E.N., Baker H.M. Lactoferrin: molecular structure, binding properties, and dynamics of lactoferrin // *Cell. and Mol. Life Sci.* — 2005. — Vol. 62. — No. 22. — P. 2531–2539.
11. Brock J. The physiology of lactoferrin // *Biochem. Cell Biol.* — 2002. — Vol. 80. — P. 1–6.
12. Brown T.A. *Génomes*. — Paris: Médecine-Sciences Flammarion, 2004. — 572 p.
13. Dyrda-Terniuk T., Pomastowski P. The multifaceted roles of bovine lactoferrin: molecular structure, isolation methods, analytical characteristics, and biological properties // *J. Agr. and Food Chem.* — 2023. — Vol. 71. — No. 51. — P. 20500–20531.
14. Griffiths A.J.F., Wessler S.R., Carroll S.B., Doebley J. *Introduction to genetic analysis*. 11th ed. — Brussels: De Boeck, 2015. — 782 p.
15. Groves M.L. The isolation of a red protein from milk // *JACS*. — 1960. — Vol. 82. — No. 13. — P. 3345–3350.
16. Gruden Š., Poklar Ulrih N. Diverse mechanisms of antimicrobial activities of lactoferrins, lactoferricins, and other lactoferrin-derived peptides // *Int. J. Mol. Sci.* — 2021. — Vol. 22. — No. 20. — Art. 11264. doi: 10.3390/ijms222011264.
17. Gürsel F.E., Akış I., Ateş A., Yardibi H., Türkay Hoştürk G., Öztürk K. EcoRI polymorphism in intron 6 of the bovine lactoferrin gene in South Anatolian Red and East Anatolian Red cattle breeds // *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. — 2013. — Vol. 39. — No. 2. — P. 183–188.
18. Hanna N., Parfait B., Vidaud D., Vidaud M. Mécanismes et conséquences des mutations [Mutation mechanisms and their consequences] // *Médecine Sci.* — 2005. — Vol. 21. — No. 11. — P. 969–980.
19. Kaminski S., Olenski K., Brym P., Malewski T., Sazanov A.A. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of the lactoferrin gene and its associations with milk performance traits in Polish Holstein–Friesian cows // *Russ. J. Genet.* — 2006. — Vol. 42. — No. 8. — P. 924–927.
20. Kaplan S. Nucleotide sequence variations of lactoferrin gene in Anatolian water buffaloes // *Fresenius Environ. Bull.* — 2018. — Vol. 27. — No. 9. — P. 6427–6432.
21. Kathiravan P., Kataria R.S., Mishra B.P. Single nucleotide polymorphism identification and sequence analysis of 5' flank-

- ing region of lactoferrin gene in Indian buffaloes (*Bubalus bubalis*) // *Livestock Sci.* – 2009. – Vol. 121. – P. 38–44.
22. Kell D.B., Heyden E.L., Pretorius E. The biology of lactoferrin, an iron-binding protein that can help defend against viruses and bacteria // *Front. Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – Art. 550441. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01221>.
 23. Lönnerdal B., Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function // *Ann. Rev. Nutr.* – 1995. – Vol. 15, N 1. – P. 93–110.
 24. Mariller Ch., Hardivillé St., Hoedt E., Huvent I., Pina-Canseco S., Pierce A. Delta-lactoferrin, an intracellular lactoferrin isoform that acts as a transcription factor // *Biochem. and Cell Biol.* – 2012. – Vol. 90. – No. 3. – P. 307–319.
 25. Mitchell M., Suh M., Hooda N., Bylsma L.C., Cohen S.S. The effect of bovine dairy products and their components on the incidence and natural history of infection: a systematic literature review // *Nutrition J.* – 2024. – Vol. 23. – No. 1. – Art. 26. doi: [10.1186/s12937-024-00923-7](https://doi.org/10.1186/s12937-024-00923-7).
 26. Pawlik A., Sender G., Korwin-Kossakowska A. Bovine lactoferrin gene polymorphism and expression in relation to mastitis resistance: a review // *Animal Sci. Papers and Repts.* – 2009. – Vol. 27. – No. 4. – P. 263–271.
 27. Schutz M.M., VanRaden P.M., Wiggins G.R. Genetic variation in lactation means of somatic cell scores for six breeds of dairy cattle // *J. Dairy Sci.* – 1994. – Vol. 77. – P. 284–293.
 28. Sharifzadeh A., Doosti A. Study of lactoferrin gene polymorphism in Iranian Holstein cattle using PCR-RFLP technique // *Global Veterinaria.* – 2011. – Vol. 6. – No. 6. – P. 530–536.
 29. Shashidharan A., Singh R., Bhasker S., Mohankumar C. Physicochemical characterization and functional site analysis of lactoferrin gene of Vechur cow // *Veterinary World.* – 2011. – Vol. 4. – No. 6. – P. 272–277.
 30. Singh A.P., Ramesha K.P., Isloor S., Divya P., Rao A., Basavaraju M., Das D.N., Munde U. Single nucleotide polymorphisms in lactoferrin gene associated with lactoferrin content in milk and somatic cell count in Deoni cows // *Pakistan Veterinary J.* – 2015. – Vol. 35. – No. 3. – P. 277–282.
 31. Wojdak-Maksymiec K., Kmiec M., Ziemak J. Associations between bovine lactoferrin gene polymorphism and somatic cell count in milk // *Veterinarni Med.* – 2006. – Vol. 51. – No. 1. – P. 14–20.
 32. Yami H.A., Tahmoorespur M., Javadmanesh A., Tazarghi A., Sekhavati M.H. The immunomodulatory effects of lactoferrin and its derived peptides on NF- κ B signaling pathway: a systematic review and meta-analysis // *Immunity, Inflamm. and Dis.* – 2023. – Vol. 11. – No. 8. – e972. doi: [10.1002/iid3.972](https://doi.org/10.1002/iid3.972).
 33. Zhou L., Yang Y., Zhong H., Kong L., Xin L., Di H.S., Wang G.L. Detection and characterization of PCR–SSCP markers of the bovine lactoferrin gene for clinical mastitis // *J. Animal Sci.* – 2006. – Vol. 19. – P. 1399–1403.

References

1. Arzumanyan VG, Kolyganova TI, Svitich OA, Samoylikov PV, Konanykhina SYU, Zaytseva TA, Zverev VV. Vklad laktoferrina, syvorotochnogo al'bumina i sekretornogo immunoglobulina klassa A v antimikrobnuyu aktivnost' syvorotki grudnogo moloka. *Infektsiya i immunitet* 2022; 12(3):519–526 (in Russian).
2. Beyshova I, Nurgaliyev B, Belaya Ye, Ul'yanov V, Ginayatov N, Zholdasbekova A. Assotsiatsiya geneticheskogo polimorfizma genov LTF, MBL1 i TLR-9 s ustoychivost'yu k khlamidiozu u krupnogo rogatogo skota golshitskoy porody. *Nauka i obrazovaniye* 2022; 1(69):53–62 (in Russian).
3. Voinova VYu, Nikolayeva YeA, Shcherbakova NV, Yablonskaya MI. Vysokoproizvoditel'noye sekvenirovaniye DNK dlya identifikatsii geneticheski determinirovannykh zabolevaniy v pediatricheskoy praktike. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii* 2019; 64(1):103–109 (in Russian).
4. Dyugeyev AN, Shipulin AN. Struktura i funktsii chelovecheskogo laktoferrina; perspektivy izucheniya v akusherstve. *Akusherstvo i ginekologiya* 1991; 1:6–9 (in Russian).
5. Yepishko OA, Peshko VV, Sit'ko AA. Razrabotka i adaptatsiya metodiki genotipirovaniya krupnogo rogatogo skota po genu laktoferrina. Sel'skoye khozyaystvo – problemy i perspektivy: sb nauch tr 2019; 65–70 (in Russian).
6. Sukharev AYe, Nikolayev AA, Vasil'yev MYu. Laktoferrin i leykotsity krovi u onkologicheskikh bol'nykh. *Laboratornoye delo* 1990; 8:33–35 (in Russian).
7. Sukharev AE, Nikolaev AA, Vasiliev MYu. Uroven' syvorotochnogo laktoferrina v norme i pri patologii. *Voprosy meditsinskoy khimii* 1990; 3:81–83 (in Russian).
8. Tyulkin SV, Muratova AV, Khatypov II, Zagidullin LR, Akhmetov TM, Ravilov RKH, Vafin RR. Polimorfizm gena laktoferrina u bykov-proizvoditeley v Respublike Tatarstan. *Genetika. Aktual'nyye voprosy veterinarnoy biologii* 2015; 4(28):7–10 (in Russian).
9. Ateya AI, El-Seady YY, Atwa SM, Merghani BH, Sayed NA. Novel single nucleotide polymorphisms in lactoferrin gene and their association with mastitis susceptibility in Holstein cattle. *Genetika* 2016; 48(1):199–210.
10. Baker EN, Baker HM. Lactoferrin: molecular structure, binding properties, and dynamics of lactoferrin. *Cell and Mol Life Sci* 2005; 62(22):2531–2539.
11. Brock J. The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell Biol* 2002; 80:1–6.
12. Brown TA. *Génomes*. Paris: Médecine-Sciences Flammarion, 2004: 572.
13. Dyrda-Terniuk T, Pomastowski P. The multifaceted roles of bovine lactoferrin: molecular structure, isolation methods, analytical characteristics, and biological properties. *J Agr and Food Chem* 2023; 71(51):20500–20531.
14. Griffiths AJF, Wessler SR, Caroll SB, Doebley J. *Introduction to genetic analysis*. 11th ed. Brussels: De Boeck, 2015: 782.

15. Groves ML. The isolation of a red protein from milk. *JACS* 1960; 82(13):3345–3350.
16. Gruden Š, Poklar Ulrih N. Diverse mechanisms of antimicrobial activities of lactoferrins, lactoferricins, and other lactoferrin-derived peptides. *Int J Mol Sci* 2021; 22(20):11264. doi: 10.3390/ijms222011264.
17. Gürsel FE, Akış I, Ateş A, Yardibi H, Türkey Hoştürk G, Öztapak K. EcoRI polymorphism in intron 6 of the bovine lactoferrin gene in South Anatolian Red and East Anatolian Red cattle breeds. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2013; 39(2):183–188.
18. Hanna N, Parfait B, Vidaud D, Vidaud M. Mécanismes et conséquences des mutations [Mutation mechanisms and their consequences]. *Médecine Sci* 2005; 21(11):969–980.
19. Kaminski S, Olenski K, Brym P, Malewski T, Sazanov AA. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of the lactoferrin gene and its associations with milk performance traits in Polish Holstein–Friesian cows. *Russ J Genet* 2006; 42(8):924–927.
20. Kaplan S. Nucleotide sequence variations of lactoferrin gene in Anatolian water buffaloes. *Fresenius Environ. Bull* 2018; 27(9):6427–6432.
21. Kathiravan P, Kataria RS, Mishra BP. Single nucleotide polymorphism identification and sequence analysis of 5' flanking region of lactoferrin gene in Indian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Livestock Sci* 2009; 121:38–44.
22. Kell DB, Heyden EL, Pretorius E. The biology of lactoferrin, an iron-binding protein that can help defend against viruses and bacteria. *Front Immunol* 2020; 11:550441. doi: 10.3389/fimmu.2020.01221.
23. Lönnnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Ann Rev Nutrit* 1995; 15(1):93–110.
24. Mariller Ch, Hardivillé St, Hoedt E, Huvent I, Pina-Canseco S, Pierce A. Delta-lactoferrin, an intracellular lactoferrin isoform that acts as a transcription factor. *Biochem and Cell Biol* 2012; 90(3):307–319.
25. Mitchell M, Suh M, Hooda N, Bylsma LC, Cohen SS. The effect of bovine dairy products and their components on the incidence and natural history of infection: a systematic literature review. *Nutrition J* 2024; 23(1):26. doi: 10.1186/s12937-024-00923-7.
26. Pawlik A, Sender G, Korwin-Kossakowska A. Bovine lactoferrin gene polymorphism and expression in relation to mastitis resistance: a review. *Animal Sci Papers and Repts* 2009; 27(4):263–271.
27. Schutz MM, VanRaden PM, Wiggans GR. Genetic variation in lactation means of somatic cell scores for six breeds of dairy cattle. *J Dairy Sci* 1994; 77:284–293.
28. Sharifzadeh A, Doosti A. Study of lactoferrin gene polymorphism in Iranian Holstein cattle using PCR-RFLP technique. *Global Veterinaria* 2011; 6(6):530–536.
29. Shashidharan A, Singh R, Bhasker S, Mohankumar C. Physicochemical characterization and functional site analysis of lactoferrin gene of Vechur cow. *Veterinary World* 2011; 4(6):272–277.
30. Singh AP, Ramesha KP, Isloor S, Divya P, Rao A, Basavaraju M, Das DN, Munde U. Single nucleotide polymorphisms in lactoferrin gene associated with lactoferrin content in milk and somatic cell count in Deoni cows. *Pakistan Veterinary J* 2015; 35(3):277–282.
31. Wojdak-Maksymiec K, Kmiec M, Ziemak J. Associations between bovine lactoferrin gene polymorphism and somatic cell count in milk. *Veterinarni Med* 2006; 51(1):14–20.
32. Yami HA, Tahmoorespur M, Javadmanesh A, Tazarghi A, Sekhavati MH. The immunomodulatory effects of lactoferrin and its derived peptides on NF- κ B signaling pathway: a systematic review and meta-analysis. *Immunity, Inflammat and Dis* 2023; 11(8):e972. doi: 10.1002/iid3.972.
33. Zhou L, Yang Y, Zhong H, Kong L, Xin L, Di HS, Wang GL. Detection and characterization of PCR–SSCP markers of the bovine lactoferrin gene for clinical mastitis. *J Animal Sci* 2006; 19:1399–1403.

NUCLEOTIDE SUBSTITUTIONS IN THE LACTOFERRIN GENE AND THEIR CHARACTERISTICS

A. DIABATE, S.N. MARZANOVA, V.A. ZHUCHKOV

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA named after K.I. Skryabin, Moscow

This article provides an analytical overview of potential nucleotide substitutions in the bovine lactoferrin (LTF) gene and their characteristics, based on a synthesis of the existing scientific literature. Previous studies have employed a range of methods, including Sanger PCR sequencing, melting curve analysis, next-generation sequencing (NGS), restriction fragment length polymorphism (RFLP), and allele-specific PCR, to investigate polymorphisms within the LTF gene. These studies identified various types of nucleotide substitutions, including single nucleotide polymorphisms (SNPs), insertions, deletions, as well as missense and nonsense mutations. The detected polymorphisms were localized in exonic, intronic, and promoter regions of the LTF gene. Additionally, published data on allele and genotype frequencies have confirmed the effects of these substitutions on protein structure, antimicrobial activity, and

expression levels in milk. The analysis of the scientific literature made it possible to identify associations between certain mutations in the LTF gene and economically important traits in cattle, namely milk productivity, the quality of produced milk, and resistance to certain infectious diseases. The obtained data suggest that lactoferrin can be considered a potential selection marker for the development of healthier and more productive livestock populations. In addition, the study examined possible ways to improve breeding programs through the integration of genetic research.

Keywords: lactoferrin; LTF gene; nucleotide substitutions; *SNPs*; cattle; genetic selection; antibacterial activity; DNA sequencing; milk productivity.

Address:

Diabate A.

postgraduate student, Department of Immunology and Biotechnology,
Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology –
MVA named after K.I. Skryabin

E-mail: alassane.diabate.142@gmail.com

Для цитирования:

Диабате А., Марзанова С.Н., Жучков В.А. Нуклеотидные замены в гене лактоферрина и их характеристики. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2026; 22(1):115–126.

For citation:

Diabate A., Marzanova S.N., Zhuchkov V.A. Nucleotide substitutions in the lactoferrin gene and their characteristics. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2026; 22(1):115–126 (in Russian).

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

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

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



Подписано к печати 31.03.2026
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 8,0. Тираж 1000 экз.

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