

УДК 615.072:616-097:579.841.95:604

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-196-207>

Научная статья | Scientific article



Разработка защитной среды высушивания и режима лиофилизации для стабилизации диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового

С.А. Курчева ✉, А.Г. Кошкидько, И.В. Жарникова, Д.В. Русанова, А.А. Семирчева, О.Л. Старцева, Е.В. Жданова, М.М. Курноскина, И.С. Тюменцева

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ул. Советская, д. 13–15, г. Ставрополь, 355035, Российская Федерация

✉ Курчева Светлана Александровна; kurcheva@yandex.ru

Резюме

Практическое применение эритроцитарных диагностических препаратов выявило недостатки, связанные с их транспортировкой на значительные расстояния с возможным несоблюдением режимов холодовой цепи, что может привести к полной потере их биологической активности. Для стабилизации основных свойств жидких форм эритроцитарных диагностических препаратов в настоящее время необходима разработка технологии получения лиофилизированных форм диагностикумов, которая позволит сохранить первоначальные свойства препарата в течение длительного времени. **Цель работы:** разработка защитной среды высушивания и режима лиофилизации для стабилизации диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового. **Материалы и методы:** были использованы вспомогательные вещества для подготовки защитных сред (желатин, тиомочевина, трегалоза, сахароза, декстран, твин 80). Для контроля чувствительности и специфичности лиофилизированных диагностикумов использовали 9 штаммов гомологичных и гетерологичных микроорганизмов разных родов и видов. При изучении стабильности основных показателей качества препаратов для диагностики *in vitro* (внешний вид высушенного препарата; потеря в массе при высушивании; растворимость, внешний вид восстановленного препарата; внешний вид препарата после оттаивания; чувствительность; специфичность) учитывали температуры различных климатических зон, в которых предполагается их реализация и использование. **Результаты:** разработаны и использованы стабилизирующие защитные среды с различным составом, с последующей сублимационной сушкой препарата и постановкой контрольных исследований. Наиболее перспективной признана среда высушивания для эритроцитарных диагностикумов, содержащая в своем составе меньшее количество ингредиентов – 6% декстрана, 0,06% твин 80 и азид натрия до 0,01%, как наиболее простая в исполнении и обеспечивающая полное сохранение качественных показателей препарата. Отработан рентабельный 12–14-часовой режим лиофилизации. **Выводы:** по совокупности полученных результатов изучения стабильности в реальном времени (долговременная стабильность) и ускоренном исследовании стабильности лиофилизированных форм диагностикума показана возможность хранения в течение двух лет при регламентированной температуре от 2 до 8 °С, а также в условиях повышенных и пониженных температур при 30±2 °С и минус 18 °С соответственно. Отрицательного влияния указанных температур на результаты контролируемых показателей не выявлено.

Ключевые слова: туляремия; среда высушивания; стабильность препаратов; реакция непрямо́й гемагглютинации; лиофилизация

© С.А. Курчева, А.Г. Кошкидько, И.В. Жарникова, Д.В. Русанова, А.А. Семирчева, О.Л. Старцева, Е.В. Жданова, М.М. Курноскина, И.С. Тюменцева, 2022

Для цитирования: Курчева С.А., Кошкидько А.Г., Жарникова И.В., Русанова Д.В., Семирчева А.А., Старцева О.Л., Жданова Е.В., Курноскина М.М., Тюменцева И.С. Разработка защитной среды высушивания и режима лиофилизации для стабилизации диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(2):196–207. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-196-207>

Development of a protective lyophilisation medium and conditions to stabilise the erythrocyte diagnostic preparation of tularaemia immunoglobulin

S.A. Kurcheva ✉, A.G. Koshkidko, I.V. Zharnikova, D.V. Rusanova, A.A. Semircheva, O.L. Startseva, E.V. Zhdanova, M.M. Kurnoskina, I.S. Tyumentseva

Stavropol Antiplague Institute, 13–15 Sovetskaya St., Stavropol 355035, Russian Federation

✉ Svetlana A. Kurcheva; kurcheva@yandex.ru

Abstract

Liquid erythrocyte diagnostic preparations have a practical disadvantage; i.e., long-distance transportation involving possible non-compliance with cold-chain requirements may result in a complete loss of biological activity. A lyophilisation technology is necessary to ensure that the preparations retain their original properties for a long time. **The aim of the work** was to develop a protective medium and conditions for lyophilisation to stabilise the erythrocyte diagnostic preparation of tularaemia immunoglobulin. **Materials and methods:** Gelatin, thiourea, trehalose, sucrose, dextran, and Tween 80 were used as excipients for protective media. The authors used nine strains of homologous and heterologous microorganisms of different genera and species to control the lyophilised diagnostic preparation sensitivity and specificity. Evaluation of the main stability-related quality attributes (appearance of the dried preparation, loss on drying, solubility, appearance after reconstitution, appearance after settling, sensitivity, specificity) considered the temperatures specific to the climatic zones where the in vitro diagnostics is intended to be marketed and used. **Results:** The authors developed protective stabilising media with different compositions, used them in freeze-drying of the preparation and carried out control testing. The most promising was the lyophilisation medium containing a smaller amount of ingredients –6% of dextran, 0.06% of Tween 80 and up to 0.01% of sodium azide—as it was the simplest one to prepare and ensured complete preservation of the quality attributes. The authors carried out practical evaluation of lyophilisation procedures, and the 12–14-hour procedure proved to be the most cost-effective. **Conclusions:** The results of long-term, or real time, and accelerated stability testing of the lyophilised diagnostic preparation demonstrated the possibility of two-year storage at a labelled temperature of 2–8 °C, as well as at elevated and low temperatures of 30±2 °C and –18 °C, respectively. The tests showed no negative effects of the temperatures on the controlled quality attributes.

Keywords: tularaemia; lyophilisation medium; stability; indirect hemagglutination test; lyophilisation

For citation: Kurcheva S.A., Koshkidko A.G., Zharnikova I.V., Rusanova D.V., Semircheva A.A., Startseva O.L., Zhdanova E.V., Kurnoskina M.M., Tyumentseva I.S. Development of a protective lyophilisation medium and conditions to stabilise the erythrocyte diagnostic preparation of tularaemia immunoglobulin. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(2):196–207. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-196-207>

Введение

Туляремия – природно-очаговая зоонозная инфекция, которая занимает относитель-

но скромное место в структуре инфекционной патологии человека по уровню регистрируемой заболеваемости в Российской Федерации.

Актуальность проблемы определяется различными факторами и особенностями эпидемического проявления инфекции, возбудитель которой принадлежит к особо опасным микроорганизмам II группы патогенности (опасности), способен вызывать эпидемические проявления чрезвычайного характера и является потенциальным агентом биотерроризма [1–3].

В связи со сказанным лабораторная диагностика туляремии имеет важнейшее значение в комплексе противоэпидемических мероприятий и складывается из индикации и идентификации возбудителя или его специфических антигенов и определения сывороточных антител у человека и восприимчивых животных [4, 5]. При этом, как правило, на практике предпочтение отдается серологическим и молекулярно-генетическим методам, характеризующимся экспрессностью, высокой специфичностью, чувствительностью¹.

Несмотря на появление новых методов исследования в лабораторной диагностике инфекций, до сих пор остается актуальной реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)², обладающая высокой чувствительностью и простотой постановки [6].

Специалистами ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора разработана технология изготовления и осуществляется производство диагностикума эритроцитарного туляремиального иммуноглобулинового в жидкой форме «РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ» (срок годности 12 месяцев). Препарат допущен к обращению на территории Российской Федерации приказом Росздравнадзора³.

Основной и существенный недостаток эритроцитарных диагностикумов в жидкой форме связан со сложностью соблюдения условий хранения при транспортировке этих препаратов на значительные расстояния, при несоблюдении температурного режима возможна полная потеря биологической активности диагностикума. В связи с этим возникла необходимость в разработке условий стабилизации эритроцитарных диагностикумов. Наиболее доступным и перспективным методом является лиофильное высушивание, направленное на максимальное удаление свободной и частично связанной влаги. Сублимированные препараты сохраняют

первоначальные свойства в течение длительного периода хранения и становятся более устойчивыми к факторам внешнего воздействия, возникающим при их транспортировке конечному потребителю [7–9].

За последние несколько лет были проведены многочисленные исследования, которые показали, что этапы замораживания и сушки в процессе лиофилизации могут повлиять на структуру и функцию белков, что приводит к потере их активности и устойчивости [10–12]. Применение сред высушивания позволяет защитить диагностикумы при замораживании и лиофилизации. Следовательно, выбор состава защитных сред в оптимальной концентрации и выбор соответствующих параметров рабочего процесса во время лиофилизации имеют решающее значение для стабилизации белковых препаратов. Защитная среда должна иметь мелкопористую, достаточно плотную структуру, обязательно быть гидрофильной и характеризоваться невысокой концентрацией компонентов, так как в случае невыполнения этих условий увеличивается время процесса лиофилизации, а повышенный уровень остаточной влажности может снизить растворимость препарата.

Цель работы – разработка защитной среды высушивания и режима лиофилизации для стабилизации диагностикума эритроцитарного туляремиального иммуноглобулинового.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- осуществить подбор режима (условий) лиофильного высушивания и состава эффективных защитных сред, не влияющих на исходные свойства диагностического препарата;
- получить экспериментально-производственные серии лиофилизированной формы диагностикума эритроцитарного туляремиального иммуноглобулинового и провести верификацию характеристик препарата после лиофилизации. Методом ускоренного исследования стабильности определить срок годности лиофилизированного эритроцитарного диагностикума;
- изучить долговременную стабильность функциональных характеристик (в соответствии со сроком годности) лиофилизированной формы диагностикума эритроцитарного туляремиального иммуноглобулинового и стабильность

¹ Курчева С.А. Разработка биотехнологии производства иммунобиологических препаратов для диагностики туляремии и индикации ее возбудителя: дис. ... канд. биол. наук. Ставрополь; 2011.

² Жарникова И.В. Методологические подходы и разработка биотехнологии иммунобиологических препаратов для диагностики инфекционных особо опасных заболеваний и детекции их возбудителей: дис. ... д-ра биол. наук. Ставрополь; 2004.

³ Регистрационное удостоверение на медицинское изделие «Набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляремиальный иммуноглобулиновый жидкий» («РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ») по ТУ 9388-023-01897080-2010 от 29.01.2014 № ФСР 2011/10271.

препарата при хранении в различных температурных режимах.

Материалы и методы

Материалы

Декстран (ApplChem, Германия); сахароза (Sigma-Aldrich, США); трегалоза 100% (Swanson, США); желатин (HiMedia Laboratories, Индия); твин 80 (Sigma-Aldrich, США); азид натрия (Molekula, Германия); хлорид натрия (ООО «ТД Малиновое Озеро», Россия); тиомочевина (Shandong Efirm Biochemistry and Environmental Protection Co., Ltd., Китай); питательная среда для культивирования и выделения туляреимного микроба сухая (FT-агар) (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия); агар Альбими (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия); питательный агар для культивирования микроорганизмов, готовый к применению (агар Хоттингера) (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия); средство «Прогресс» по ТУ 2383-018-52662802-2002 с изм. № 1 (ООО «АМС Медиа», Россия); сыворотка диагностическая туляреимная сухая для реакции агглютинации по ТУ 8852-003-01898090-2010 (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия); натрия гидроокись (ООО «НПФ Невский химик», Россия); хлороформ очищенный (ПАО «Химпром», Россия); формалин (ООО ОХК «Щекиноазот», Россия); агар микробиологический (ООО «ЭКОлаб-Диагностика», Россия); вода дистиллированная (изготовлена по ГОСТ Р 58144-2018); набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляреимный иммуноглобулиновый жидкий («РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ») (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия).

При выполнении работы использовали: 50% взвесь формализированных эритроцитов барана (серии 1–18), прошедших внутренний контроль на гомогенность и отсутствие склонности к спонтанному склеиванию [13]; экспериментальные серии IgG (фракционированные из туляреимных сывороток каприловым методом), полученные в научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

При контроле специфичности и чувствительности лиофилизированного диагностикума использовали штаммы гомологичных (*Francisella tularensis holarctica* 15 НИИЭГ, *F. tularensis holarctica* Miura, *F. tularensis nearctica* Schu, *F. tularensis mediaasiatica* 55) и гетерологичных (*Brucella abortus* 544, *B. melitensis* 16-M, *B. suis* 1330, *Yersinia enterocolitica* 178, 383) микроорганизмов, находящиеся в рабочей коллекции научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. Штаммы микроорганизмов обладали типичными культуральными, морфологическими, тинкториальными и другими биологическими свойствами. При работе руководствовались санитарными правилами и нормами⁴.

Перед постановкой РНГА подготавливали взвеси микроорганизмов в концентрации 1×10^8 м.к./мл с использованием отраслевого стандартного образца мутности бактериальных взвесей ОСО 42-48-85⁵.

Оборудование и расходные материалы

Весы технические ALC 2100 d2 (ACCULAB, США); весы лабораторные электронные OHAUS Pioneer (OHAUS, КНР); микроскоп биологический Meiji Techno MT6000 (Meiji Techno, Япония); шкаф сушильный вакуумный ШСВ-45к (ОАО «Казанский завод медицинской аппаратуры», Россия); низкотемпературный стол (Elcold, Дания); рНметр Sartorius PB-11 (Sartorius, Германия); термостат электрический суховоздушный ТС-1/20 (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия); холодильник LCv 4010-24B-001 (Liebherr, Австрия); лиофильная сушка Alpha 2-4 LSCplus (Martin Christ, Германия); центрифуга SIGMA 6-K15 (Sigma Laborzentrifugen, Германия); настольный орбитальный шейкер с открытым типом платформы MaxQ2000 (Thermo Scientific, США); планшет полимерный иммунологический 72 лунки (ООО «ПФК Современные технологии», Россия); планшет полимерный для иммунологических реакций круглодонный 96-луночный (ОАО «Фирма Медполимер», Россия).

Методы

Сенсибилизация эритроцитов. Перед сенсибилизацией взвесь формализированных эритроцитов разводили 0,9% раствором хлорида натрия до концентрации 20%. Сенсибилизацию эритро-

⁴ СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4).

⁵ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0008.15 Определение концентрации микробных клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

цитов иммуноглобулинами класса G проводили в присутствии 2% раствора средства «Прогресс» при температуре 45 °С, рН 5,0 в течение 12 ч.

Контроль параметров эритроцитарного диагностикума. Контроль характеристик диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового лиофилизированного проводили по следующим параметрам.

Внешний вид. Пористая масса коричневого цвета, уплотненная в таблетку.

После растворения (в течение 1 мин) – гомогенная взвесь коричневого цвета. После отстаивания образуются два слоя: надосадов – прозрачная бесцветная или светло-желтого цвета жидкость и осадок – плотный коричневый, разбивающийся при встряхивании.

Определение потери в массе при высушивании. Контроль проводили весовым методом⁶. Потеря в массе при высушивании не должна превышать 3%.

Растворимость. В течение 1 мин содержимое ампулы с диагностикумом эритроцитарным туляремийным иммуноглобулиновым лиофилизированным должно полностью растворяться в 4,0 мл 0,9% раствора хлорида натрия.

Чувствительность. Диагностикум должен выявлять *F. tularensis* в концентрации $3,12 \times 10^6$ м.к./мл при постановке реакции непрямой гемагглютинации макрометодом и $6,25 \times 10^6$ м.к./мл при постановке реакции микрометодом.

Специфичность. При постановке РНГА со штаммами гетерологичных микроорганизмов в концентрации $1,0 \times 10^8$ м.к./мл должно определяться отсутствие агглютинации.

Исследования чувствительности и специфичности проводили в РНГА микро- и макрометодом по стандартной методике⁷.

В ходе изучения стабильности препарата определяли сроки годности и возможные условия хранения диагностикума. Использовали регламентированные нормативными документами методы⁸ – исследование стабильности в реальном времени (долговременная стабильность) и ускоренное исследование стабильности.

Метод ускоренного исследования стабильности: образцы выдерживали при температу-

рах, превышающих температуру его хранения в процессе обращения: при температуре 27 ± 1 °С в течение 116 сут с контрольными испытаниями каждые 15 сут, при 37 ± 1 °С в течение 47 сут с контрольными испытаниями каждые 10 сут.

Температура экспериментального хранения (t_x) должна превышать температуру хранения (t_{xp}) не менее чем на 10 °С.

Сроки экспериментального хранения в зависимости от температурного интервала рассчитывали в соответствии с ОФС 1.1.0009.18⁹. Срок годности (С) рассчитывали по формуле зависимости Вант-Гоффа (1):

$$C = K \times C_x, \quad (1)$$

где K – коэффициент соответствия; C_x – экспериментальный срок годности, сут.

Исследования долговременной стабильности: образцы хранили при регламентированной температуре от 2 до 8 °С, а также в условиях повышенных и пониженных температур при 30 ± 2 °С и минус 18 °С соответственно. При этом контрольные исследования проводили каждые шесть месяцев в течение первого года хранения и затем ежегодно на протяжении последующего периода испытаний.

Статистический анализ. Обработку и статистический анализ данных проводили с использованием языка программирования R для статистической обработки данных (версия 4.0.2). Анализ групповых различий проводили с использованием критерия Фишера. Значения представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. Критическим уровнем статистической значимости различий установлено значение $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение

Подбор состава защитных сред для лиофилизации диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового

При составлении композиции защитных сред необходимо использовать несколько разных наполнителей для обеспечения разных или даже противоположных защитных функций. Вслед-

⁶ Общая фармакопейная статья 1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁷ Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., ред. М.: ЗАО «Шико»; 2013.

⁸ ГОСТ Р ИСО 23640-2015. Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*. М.: Стандартинформ; 2015.

Общая фармакопейная статья 1.1.0009.18 Стабильность и сроки годности лекарственных средств. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁹ Общая фармакопейная статья 1.1.0009.18 Стабильность и сроки годности лекарственных средств. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

ствии этого в экспериментальной работе нами были использованы различные ингредиенты как наиболее перспективные составляющие разрабатываемых сред. Поверхностно-активные вещества (ПАВ) использовали для снижения денатурации белков во время замораживания за счет уменьшения границы раздела лед-вода [14], а также для упрощения постановки реакции (исключения специальной разводящей жидкости). Углеводы за счет связывания с поверхностью биологического материала защищают препарат от повреждений при высыхании [15–17]. Так, углеводы с более высокой молекулярной массой обладают меньшим защитным эффектом, поскольку имеют меньше свободных гидроксильных групп, доступных для взаимодействия с белком [18, 19]. Поэтому в качестве эффективных лиопротекторов использовали дисахариды, такие как трегалоза и сахароза. Некоторыми исследователями было обнаружено, что добавление сахарозы к препаратам при лиофилизации приводит к сдвигу температуры плавления в сторону увеличения, обеспечивая таким образом эффективную защиту препарата [20, 21]. Для лиофилизации в составе защитных сред также успешно применяются коллоиды (желатин, агар, пептон, молоко и сыворотки). Как показали исследования, желатин обладает сильным защитным действием, что связано со способностью формировать при замораживании-высушивании аморфную фазу с низкой молекулярной подвижностью [22]. Из других коллоидов нужно отметить поливинилпирролидон и полиглюкин (6% раствор декстрана в физиологическом растворе). В качестве антиоксиданта в некоторые составы была добавлена тиомочевина [23]. Азид натрия использовали как консервант и антисептик.

При выполнении экспериментальных работ было изготовлено пять защитных сред для лиофилизации диагностикума следующего состава:

- состав 1 – желатин, тиомочевина, трегалоза;
- состав 2 – желатин, тиомочевина, сахароза;
- состав 3 – декстран;
- состав 4 – сахароза;
- состав 5 – тиомочевина, трегалоза, декстран.

Составы защитных сред делили на две группы, в первую (№ 1/1, 2/1, 3/1, 4/1,5/1) добавляли: твин 80 – 0,06 г на рассчитанный объем, азид натрия до 0,01% и доводили pH растворов до 7,4 с помощью 5% раствора NaOH; во вторую группу (№ 1/2, 2/2, 3/2, 4/2, 5/2) добавляли только азид натрия в той же концентрации с доведением pH до 7,4. Ингредиентный состав разрабатываемых защитных сред, указан в таблице 1.

Далее сконструированные защитные среды смешивали с диагностикумом эритроцитарным

туляреимным иммуноглобулиновым. Объемное соотношение защитной среды к диагностикуму составляло 9:1. К предварительно полученным сенсibilизированным формализированным эритроцитам, осажденным центрифугированием (3000 об/мин, 5 мин), при постоянном перемешивании добавляли свежеприготовленные растворы сред высушивания. Для подготовки к последующей лиофилизации диагностикуму суспендировали в защитной среде до концентрации 10% и разливали в ампулы по 1 мл.

Параметры этапов лиофилизации диагностикума эритроцитарного туляреимного иммуноглобулинового

Все стадии процесса лиофилизации – замораживание, сублимация, досушивание, герметизация – являются обязательными, и от правильно подобранных параметров всех этапов зависит получение стабильных препаратов без потери их специфической активности.

Начальный этап сублимационного высушивания – замораживание материала. Препараты замораживали в морозильной камере в течение 16–18 ч при температуре минус 40 °С для дальнейшего высушивания в лиофильной установке. Следует отметить, что диагностикум перед замораживанием должен находиться в защитных средах высушивания во взвешенном состоянии.

Замороженный препарат перегружали в вакуумную камеру сублимационной установки для проведения стадии первичной сублимации (первичной сушки). Стадия первичной сублимации инициируется возникновением вакуума в камере при постепенном нагреве замороженной матрицы в объеме, достаточном для сублимации льда. В течение этого периода необходимо установить правильный баланс между объемом подающегося тепла (теплопередачей) и сублимацией воды (массообменом), чтобы во время сушки не происходило чрезмерного перегрева замороженного материала и возникновения побочных явлений, таких как обратное плавление, вспучивание или разрушение (коллапс).

Стадия десорбции (вторичная сушка) начинается после сублимации льда и проходит при температуре выше нуля и более низком давлении для извлечения связанной влаги. На данном этапе должно быть обеспечено достижение определенных значений остаточной влажности лиофилизата, при которых препарат сохраняет стабильность.

В ходе экспериментов были апробированы следующие протоколы сушки: «умеренный» – 24±2 ч, «ускоренный» – 13±1 ч. Учитывая

Таблица 1. Ингредиентный состав защитных сред для диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового
Table 1. Ingredient composition of protective media for the erythrocyte diagnostic preparation of tularaemic immunoglobulin

Ингредиент <i>Ingredient</i>	Состав защитных сред <i>Composition of protective media</i>									
	Состав 1/1 <i>Composition 1/1</i>	Состав 2/1 <i>Composition 2/1</i>	Состав 3/1 <i>Composition 3/1</i>	Состав 4/1 <i>Composition 4/1</i>	Состав 5/1 <i>Composition 5/1</i>	Состав 1/2 <i>Composition 1/2</i>	Состав 2/2 <i>Composition 2/2</i>	Состав 3/2 <i>Composition 3/2</i>	Состав 4/2 <i>Composition 4/2</i>	Состав 5/2 <i>Composition 5/2</i>
	(количество грамм на 100 мл объема) <i>(in g/100 mL)</i>									
Желатин <i>Gelatin</i>	1,0	1,0	-	-	-	1,0	1,0	-	-	-
Тиомочевина <i>Thiourea</i>	1,0	1,0	-	-	1,0	1,0	1,0	-	-	1,0
Трегалоза <i>Trehalose</i>	8	-	-	-	4	8	-	-	-	4
Сахароза <i>Sucrose</i>	-	10	-	15	-	-	10	-	15	-
Декстран <i>Dextran</i>	-	-	6	-	6	-	-	6	-	6
Твин 80 <i>Tween 80</i>	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	-	-	-	-	-
Азид натрия <i>Sodium azide</i>	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

то, что с увеличением количества продукта в сублимационной камере возрастают объемы пара, возникающие при сублимации и создающие дополнительные нагрузки на вакуумный насос и конденсатор, при отработке каждого режима в работу брали не более 150 ампул подготовленных эритроцитарных диагностикумов.

Наиболее экономичным и реально применимым на практике признан 12–14-часовой режим высушивания (рис. 1) для обеспечения следующих характеристик:

- замораживание препаратов при температуре минус 40 °С, т.е. достаточно низкой, чтобы избежать оттаивания, и при этом не удлиняющей процесс высушивания;
- сокращение времени удаления не только свободной, но и связанной воды в препарате за счет глубокого вакуума – 15–20 Па;
- плавного (до 25–26 °С) подвода тепла и низкой температуры конденсатора – минус 80–90 °С, для исключения оттаивания и вспенивания препарата при сохранении физико-химических (растворимость, прозрачность, цветность, потеря в массе при высушивании) и иммунобиологических (чувствительность, специфичность) свойств препаратов.

После завершения процесса высушивания препарат извлекали из камеры. Ампулы с препаратом запаивали на газо-кислородной горел-

ке в среде атмосферного воздуха. Так как все биопрепараты в лиофилизированном состоянии обладают высокой степенью гидрофильности, опай ампул с диагностикумом проводили в сухом помещении.

Таким образом, проведенные исследования показали, что соблюдение вышеописанных параметров гарантировало высокое качество высушенных диагностических препаратов.

Контроль экспериментальных серий диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового лиофилизированного

При осуществлении контроля основных характеристик полученных лиофилизатов отбирали пробы из каждой серии для оценки ключевых параметров диагностикума:

- внешний вид высушенного препарата;
- потеря в массе при высушивании;
- растворимость, внешний вид (цвет и прозрачность) восстановленного препарата; внешний вид препарата после оттаивания;
- чувствительность;
- специфичность.

В качестве препарата сравнения при исследовании чувствительности и специфичности лиофильно высушенных диагностикумов использовали «РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ».

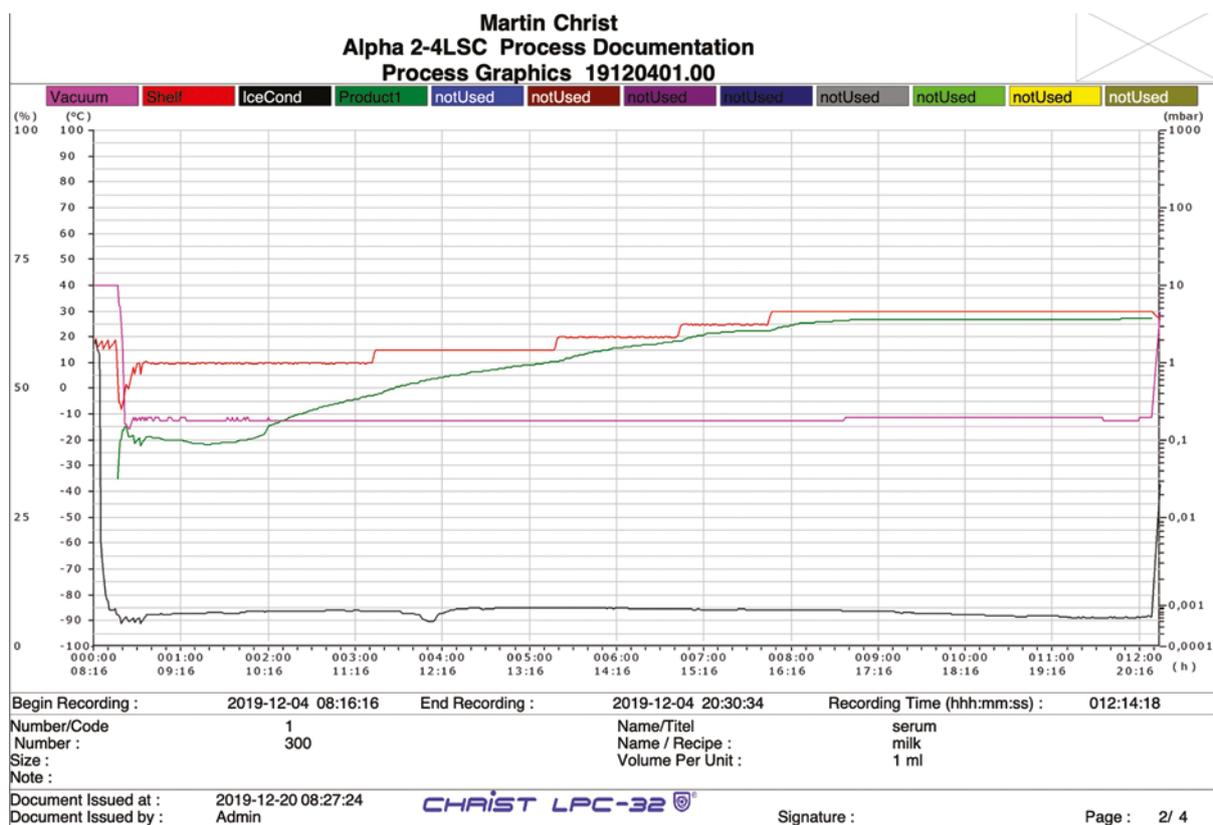


Рис. 1. График лиофилизации диагностикумов эритроцитарных туляремийных иммуноглобулиновых.

Fig. 1. Lyophilisation chart for the erythrocyte diagnostic preparation of tularaemia immunoglobulin.

Установлено, что для всех полученных серий эритроцитарных диагностикумов характерны следующие параметры:

- диагностикум эритроцитарный лиофилизированный имеет вид пористой массы, уплотненной в таблетку, коричневого цвета, без признаков микрооттаивания;
- потеря в массе при высушивании для всех серий эритроцитарных диагностикумов – $2,5 \pm 0,5\%$;
- такие параметры, как растворимость диагностикумов эритроцитарных лиофилизированных, цвет и прозрачность восстановленного препарата, его внешний вид после отстаивания, а также чувствительность имели различия и представлены в таблице 2;
- специфичность – отсутствие перекрестных реакций при постановке РНГА со штаммами гетерологичных микроорганизмов в концентрации $1,0 \times 10^8$ м.к./мл.

Наилучшие результаты были получены при использовании в качестве защитных сред составов № 1, 2 и 3 первой группы. Лиофилизаты второй группы при проведении контрольных исследований показали снижение чувствительности диагностикумов эритроцитарных туляремийных иммуноглобулиновых вплоть до ее полной утраты.

После проведения контрольных исследований полученных экспериментальных серий диагностикумов были отобраны образцы серий № 1/1, 2/1, 3/1, имеющие соответствующие представленным требованиям характеристики. При разработке дизайна испытаний стабильности учитывали температуры различных климатических зон, в которых предполагается реализация и использование диагностикумов.

Срок годности устанавливали экспериментально. Метод ускоренного исследования стабильности позволяет рассчитать сроки годности препаратов и сделать прогноз срока годности готового изделия на основании контрольных испытаний в течение хранения при различных температурах.

Для вычисления срока годности использовали формулу (1). Сводные данные представлены в таблице 3.

Все испытываемые серии лиофильно высушенного эритроцитарного диагностикума стабильно сохраняли качественные характеристики независимо от температуры и временного интервала. Результаты испытаний чувствительности и специфичности показали, что выявление гомологичных штаммов (*F. tularensis holarctica* 15 НИИЭГ, *F. tularensis holarctica* Miura, *F. tularensis*

Таблица 2. Характеристика основных параметров диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового после его лиофилизации

Table 2. Characteristics of the main parameters of the lyophilised erythrocyte diagnostic preparation of tularaemia immunoglobulin

№ серии <i>Batch No.</i>	Характеристика основных параметров <i>Characteristics of the main parameters</i>		
	растворимость ^а <i>solubility^a</i>	внешний вид восстановленного препарата / внешний вид после отстаивания <i>appearance after reconstitution / after settling</i>	чувствительность м.к./мл <i>sensitivity m.c./mL</i>
1/1	1 мин <i>1 min</i>	Гомогенная взвесь коричневого цвета / 2 слоя: надосадок — прозрачная светло-желтого цвета жидкость, осадок — плотный коричневый, разбивающийся при встряхивании <i>Homogeneous brown suspension / 2 layers: a clear, light yellow supernatant liquid and a dense brown sediment readily dispersed on shaking</i>	1,56×10 ⁶
2/1	1 мин <i>1 min</i>	Гомогенная взвесь коричневого цвета / 2 слоя: надосадок — прозрачная бесцветная жидкость, осадок — плотный коричневый, разбивающийся при встряхивании <i>Homogeneous brown suspension / 2 layers: a transparent, colourless supernatant liquid and a dense brown sediment readily dispersed on shaking</i>	1,56×10 ⁶
3/1	30 с <i>30 s</i>	Гомогенная взвесь коричневого цвета / 2 слоя: надосадок — прозрачная бесцветная жидкость, осадок — плотный коричневый, разбивающийся при встряхивании <i>Homogeneous brown suspension / 2 layers: a transparent, colourless supernatant liquid and a dense brown sediment readily dispersed on shaking</i>	1,56×10 ⁶
4/1	1 мин <i>1 min</i>	Гомогенная взвесь коричневого цвета / 2 слоя: надосадок — прозрачная светло-желтого цвета жидкость, осадок — плотный коричневый, разбивающийся при встряхивании <i>Homogeneous brown suspension / 2 layers: a transparent, light yellow supernatant liquid and a dense brown sediment readily dispersed on shaking</i>	1,25×10 ⁷
5/1	3 мин <i>3 min</i>	Наличие конгломератов / 2 слоя: надосадок — прозрачная желтого цвета жидкость, осадок — плотный коричневый, разбивающийся при встряхивании <i>Presence of conglomerates / 2 layers: a transparent, yellow supernatant liquid and a dense brown sediment readily dispersed on shaking</i>	2,5×10 ⁷
Контроль — «РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ» <i>Reference—liquid erythrocyte preparation of tularaemia immunoglobulin by Stavropol Antiplague Institute</i>			
6/н <i>none</i>	—	Гомогенная взвесь коричневого цвета / 2 слоя: надосадок — прозрачная светло-желтого цвета жидкость, осадок — плотный коричневый, разбивающийся при встряхивании <i>Homogeneous brown suspension / 2 layers: a transparent, light yellow supernatant liquid and a dense brown sediment readily dispersed on shaking</i>	1,56×10 ⁶

Примечание. «—» — не применимо.

^а Определяли согласно методике, изложенной в разделе «Материалы и методы».

Note. — not applicable.

^а The analytical procedure is described in the “Materials and methods section”.

nearctica Schu, *F. tularensis mediaasiatica* 55) составило 100% независимо от условий хранения образцов, также было отмечено отсутствие перекрестных реакций с гетерологичными штаммами *B. abortus* 544, *B. melitensis* 16-M, *B. suis* 1330, *Y. enterocolitica* 178, *Y. enterocolitica* 383, что подтверждает специфичность диагностикума.

Данные, полученные в испытаниях с использованием метода ускоренного исследования стабильности, были подкреплены результатами исследования долговременной стабильности, подтверждающими стабильность препаратов

в течение всего заявленного срока годности. При этом контрольные исследования проводили каждые шесть месяцев в течение первого года хранения и затем ежегодно на протяжении последующего периода испытаний. Образцы хранили при регламентированной температуре от 2 до 8 °С, а также в условиях повышенных и пониженных температур при 30±2 °С и минус 18 °С соответственно.

При постановке РНГА макрометодом в контролируемых образцах отмечалось полное сохранение первоначальных физико-химических свойств

Таблица 3. Результаты расчета экспериментального срока годности (С) лиофилизированной формы диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового

Table 3. Results of calculation of the experimental shelf life of the lyophilised erythrocyte diagnostic preparation of tularemia immunoglobulin

Рекомендуемая температура хранения (t_{xp}), °C <i>Recommended storage temperature, °C</i>	Экспериментальная температура хранения (t_s), °C <i>Experimental storage temperature, °C</i>	Экспериментальный срок хранения (C_s), сут <i>Experimental shelf life, day</i>	Коэффициент соответствия (K) <i>Compliance factor</i>	Срок годности (C), сут <i>Shelf life, days</i>
5±3	27±1	116	6,3	730,8
	37±1	47	15,6	733,2

препарата, его чувствительности и специфичности. Отрицательного влияния вышеуказанных температур на результаты контролируемых показателей не выявлено. По совокупности полученных результатов при исследовании стабильности показателей качества лиофилизированной формы диагностикума показана возможность хранения в течение двух лет (срок наблюдения) при регламентированной температуре, а также в условиях повышенных и пониженных температур.

Проведенные исследования показали, что при получении и изучении лиофилизированных препаратов, приготовленных с использованием разработанных защитных сред высушивания, наилучшие результаты показали защитные среды составов № 1/1, 2/1, 3/1, позволяющие предотвратить агрегацию эритроцитов, сохранить первоначальные свойства диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового в течение заявленного срока годности независимо от температурного режима хранения. Введение в состав представленных защитных сред неионного ПАВ (твин 80) предотвращает денатурацию белков с сохранением активности препарата, а также позволяет исключить из постановки реакции специальную разводящую жидкость.

Выводы

1. В результате исследований наиболее перспективной в использовании признана среда

Литература/References

1. Ираклионова НС, Сысоев ЕБ, Мась ЕС. Природные очаги опасных и особо опасных возбудителей инфекционных заболеваний. Туляремия. *Успехи современного естествознания*. 2013;(9):118–9. [Iraklionova NS, Sysuev EB, Mas ES. Natural foci of dangerous and especially dangerous pathogens of infectious diseases. Tularemia. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya* = *Advances in Current Natural Sciences*. 2013;9:118–9 (In Russ.)]
2. Кудрявцева ТЮ, Попов ВП, Мокриевич АН, Куликалова ЕС, Холин АВ, Мазепа АВ и др. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по туляремии на территории России в 2020 г., прогноз на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021;(1):32–42. [Kudryavtseva TYu, Popov VP, Mokrievich AN, Kulikalova ES, Kholin AV, Mazepa AV, et al. Epizootiological and epidemiological

высушивания для эритроцитарных диагностикумов, состоящая из 6% декстрана, 0,06% твин 80 и азида натрия до 0,01% как наиболее простая в исполнении, содержащая меньшее количество ингредиентов и позволяющая сохранить все физико-химические и иммунобиологические показатели. Отработан рентабельный 12–14-часовой режим лиофилизации.

2. Получены экспериментально-производственные серии лиофилизированной формы диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового. При осуществлении контроля основных характеристик полученных лиофилизатов показано высокое качество высушенных диагностических препаратов с сохранением исходной биологической и иммунологической активности.
3. По совокупности полученных результатов изучения стабильности в реальном времени (долговременная стабильность) и ускоренном исследовании стабильности лиофилизированных форм диагностикума показана возможность хранения в течение двух лет при регламентированной температуре от 2 до 8 °C, а также в условиях повышенных и пониженных температур при 30±2 °C и минус 18 °C соответственно. Отрицательного влияния указанных температур на результаты контролируемых показателей не выявлено.

situation on tularemia in Russia in 2020, the forecast for 2021. *Problemy osobo opasnykh infektsii* = *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2021;(1):32–42 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-1-32-42>

3. Старцева ОЛ, Курчева СА. Прогнозирование сроков годности иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих туляремийных сухих. *Здоровье населения и среда обитания – ЗНССО*. 2019;(2):56–60. [Startseva OL, Kurcheva SA. Shelf life prediction of diagnostic fluorescent tularemia dry immunoglobulins. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya* – *ZNIS0* = *Public Health and Life Environment – PH&LE*. 2019;(2):56–60 (In Russ.)]
4. Тюменцева ИС, Афанасьев ЕН, Алиева ЕВ, Курчева СА, Гаркуша ЮЮ. Антигены и антисыворотки

- F. tularensis*: к вопросу иммунодиагностики туляремии. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2012;1:49–52. [Tyumenceva IS, Afanasev EN, Alieva EV, Kurcheva SA, Garkusha YY. Antigens and antisera of *F. tularensis*: on the issue of tularemia immunodiagnosis. *Meditinskiiy vestnik Severnogo Kavkaza = Medical News of North Caucasus*. 2012;1:49–52 (In Russ.)]
- Жарникова ИВ, Жданова ЕВ, Жарникова ТВ, Старцева ОЛ, Курчева СА, Геогджаян АС и др. Сравнительная характеристика биотехнологии получения эритроцитарных и латексных диагностикумов для выявления возбудителя туляремии. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2019;15(4):27–31. [Zharnikova IV, Zhdanova EV, Zharnikova TV, Startseva OL, Kurcheva SA, Geogjayan AS, et al. Comparative characteristics of biotechnology for the production of erythrocyte and latex diagnosticums to identify the causative agent of tularemia. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im. Yu.A. Ovchinnikova = Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology*. 2019;15(4):27–31 (In Russ.)]
 - Жарникова ИВ, Ефременко ВИ, Жарникова ТВ, Курчева СА, Кальной СМ, Ефременко ДВ и др. Серологические методы выявления возбудителя туляремии и их оценка. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019;(4):32–8. [Zharnikova IV, Efremenko VI, Zharnikova TV, Kurcheva SA, Kalnoj SM, Efremenko DV, et al. Serological methods for detection of the causative agent of tularemia and their evaluation. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2019;(4):32–8 (In Russ.)] <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-4-32-38>
 - Кошкидько АГ, Курчева СА, Жарникова ИВ, Старцева ОЛ. Разработка защитной среды высушивания для стабилизации эритроцитарного антигенного диагностикума. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2020;16(4):12–6. [Koshkidko AG, Kurcheva SA, Zharnikova IV, Starceva OL. Development of a protective drying medium to stabilize erythrocyte antigenic tularemia diagnosticum. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im. Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology*. 2020;16(4):12–6 (In Russ.)]
 - Жученко МА, Пашкова МА, Потепенко ОВ. Лيوфилизация биопрепаратов в двухкамерных шприцах. *Биотехнология*. 2015;(4):79–84. [Zhuchenko MA, Pashkova MA, Potapenko OV. Freeze-drying of biopreparations in dual-chamber syringes. *Biotekhnologiya = Russian Journal of Biotechnology*. 2015;(4):79–84 (In Russ.)]
 - Мустафина ЭН, Мустафин ТР, Садыков НС, Юсупов СА. Способы хранения культур *Clostridium botulinum*. *Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана*. 2017;229(1):27–30. [Mustafina EN, Mustafin TR, Sadykov NS, Yusupov SA. Ways of storage *Clostridium botulinum*. *Uchenye zapiski KGAVM im. N.E. Bauman = Scientific Notes Kazan Bauman State Academy of Veterinary Medicine*. 2017;229(1):27–30 (In Russ.)]
 - Jena S, Krishna Kumar N, Aksan A, Suryanarayanan R. Stability of lyophilized albumin formulations: role of excipient crystallinity and molecular mobility. *Int J Pharm*. 2019;569:118568. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118568>
 - Piszkiwicz S, Pielak GJ. Protecting enzymes from stress-induced inactivation. *Biochemistry*. 2019;58(37):3825–33. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00675>
 - Manohar P, Ramesh N, Improved lyophilization conditions for long-term storage of bacteriophages. *Sci Rep*. 2019;9(1):15242. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51742-4>
 - Жарникова ИВ, Кошкидько АГ, Курчева СА, Жданова ЕВ, Старцева ОЛ, Тюменцева ИС и др. Способ приготовления эритроцитарного диагностикума иммуноглобулинового туляремийного. Патент Российской Федерации № 2747420; 2021. [Zharnikova IV, Koshkidko AG, Kurcheva SA, Zhdanova EV, Startseva OL, Tyumentseva IS, et al. Method of preparation of erythrocyte immunoglobulin tularemia diagnosticum. Patent of the Russian Federation № 2747420; 2021 (In Russ.)]
 - Chang BS, Kendrick BS, Carpenter JF. Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. *J Pharm Sci*. 1996;85(12):1325–30. <https://doi.org/10.1021/js960080y>
 - Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM, Anchordoguy TJ. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology*. 1990;27:219–31. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(90\)90023-W](https://doi.org/10.1016/0011-2240(90)90023-W)
 - Prestrelski SJ, Arakawa T, Carpenter JF. Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization: II. Structural studies using infrared spectroscopy. *Arch Biochem Biophys*. 1993;303(2):465–73. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1310>
 - Carpenter JF, Prestrelski SJ, Arakawa T. Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization: I. Enzyme activity and calorimetric studies. *Arch Biochem Biophys*. 1993;303(2):456–64. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1309>
 - Crowe LM, Reid DS, Crowe JH. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys J*. 1996;71(4):2087–93. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79407-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79407-9)
 - Izutsu K, Yoshioka S, Kojima S. Increased stabilizing effects of amphiphilic excipients on freeze-drying of lactate dehydrogenase (LDH) by dispersion into sugar matrices. *Pharm Res*. 1995;12(6):838–43. <https://doi.org/10.1023/A:1016252802413>
 - Han Y, Jin BS, Lee SB, Sohn Y, Joung JW, Lee JH. Effects of sugar additives on protein stability of recombinant human serum albumin during lyophilization and storage. *Arch Pharm Res*. 2007;30(9):1124–31. <https://doi.org/10.1007/BF02980247>
 - Bolje A, Gobec S. Analytical techniques for structural characterization of proteins in solid pharmaceutical forms: an overview. *Pharmaceutics*. 2021;13(4):534. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040534>
 - Грачева ИВ, Осин АВ. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016;(3):5–12. [Gracheva IV, Osin AV. Mechanisms of damaging bacteria during lyophilization and protective activity of shielding media. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(3):5–12 (In Russ.)] <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-3-5-12>
 - Охупкина ВЮ. Методы поддержания микробных культур. Часть 2. Лيوфилизация. *Теоретическая и прикладная экология*. 2009;(4):21–32. [Ochapkina VYu. Methods of microbe cultures maintenance. Part 2. Liophylisation. *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya = Theoretical and Applied Ecology*. 2009;(4):21–32 (In Russ.)]

Вклад авторов. С.А. Курчева — идея и дизайн исследования, анализ и интерпретация результатов; обсуждение результатов исследования, формирование концепции статьи, написание текста рукописи, редактирование и дополнение текста рукописи; А.Г. Кошкидько — сбор и анализ данных литературы, выполнение экспериментальных работ по приготовлению сред высушивания, лиофилизации и контролю изготовленных серий препаратов, обработка и обобщение экспериментальных данных, обсуждение результатов исследования; И.В. Жарникова — разработка дизайна исследования, разработка и корректировка протокола лиофильного высушивания, анализ и интерпретация результатов, обсуждение результатов исследования, редактирование текста рукописи; Д.В. Русанова — редактирование текста рукописи, окончательное утверждение версии рукописи для публикации; А.А. Семирчева — экспериментальные работы по приготовлению сред высушивания, контроль изготовленных серий препаратов; О.Л. Старцева — уточнение дизайна исследований, обсуждение результатов исследования, редактирование текста рукописи; Е.В. Жданова — изготовление эритроцитарных диагностикумов в жидкой форме; М.М. Курноскина — подготовка рукописи к публикации; И.С. Тюменцева — уточнение дизайна исследований, консультативная помощь в подборе эффективных криопротекторов.

Благодарности. Исследования проводились без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contribution. S.A. Kurcheva—elaboration of the study idea and design, analysis, interpretation and discussion of the results, development of the concept of the article, writing, editing and supplementation of the text; A.G. Koshkidko—collection and analysis of literature data, preparation of media, lyophilisation and control of the manufactured batches, processing and consolidation of experimental data, discussion of the research results; I.V. Zharnikova—elaboration of the study design; development and correction of the freeze-drying protocol, analysis, interpretation and discussion of the results, editing of the manuscript; D.V. Rusanova—editing and final approval of the manuscript for publication; A.A. Semircheva—preparation of media, control of the manufactured batches; O.L. Startseva—refinement of the study design, discussion of the results, editing of the manuscript; E.V. Zhdanova—production of liquid erythrocyte diagnostic preparations; M.M. Kurnoskina—preparation of the manuscript for publication; I.S. Tyumentseva—refinement of the study design, advisory assistance in the selection of effective cryoprotectors.

Acknowledgements. The study was performed without financial support.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Об авторах / Authors

Курчева Светлана Александровна, канд. биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3564-0791>
kurcheva@yandex.ru

Кошкидько Александра Геннадьевна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6617-9504>
koshkidko_ag@snipchi.ru

Жарникова Ирина Викторовна, д-р биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8443-4089>
ivj-biotech@yandex.ru

Русанова Диана Владимировна, канд. мед. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2229-6570>
dianarus2010@rambler.ru

Семирчева Анастасия Александровна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3660-2073>
semircheva_aa@snipchi.ru

Старцева Ольга Леонидовна, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5493-5296>
starceva_ol@snipchi.ru

Жданова Елена Владимировна, канд. биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5360-3786>
jdanova_ev@snipchi.ru

Курноскина Мария Михайловна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8265-5128>
kurnoskina_mm@snipchi.ru

Тюменцева Ирина Степановна, д-р мед. наук, проф.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4391-2195>
tumenceva_is@snipchi.ru

Svetlana A. Kurcheva, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3564-0791>
kurcheva@yandex.ru

Aleksandra G. Koshkidko. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6617-9504>
koshkidko_ag@snipchi.ru

Irina V. Zharnikova, Dr. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8443-4089>
ivj-biotech@yandex.ru

Diana V. Rusanova, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2229-6570>
dianarus2010@rambler.ru

Anastasia A. Semircheva. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3660-2073>
semircheva_aa@snipchi.ru

Olga L. Startseva, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5493-5296>
starceva_ol@snipchi.ru

Elena V. Zhdanova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5360-3786>
jdanova_ev@snipchi.ru

Mariya M. Kurnoskina. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8265-5128>
kurnoskina_mm@snipchi.ru

Irina S. Tyumentseva, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4391-2195>
tumenceva_is@snipchi.ru

Поступила 07.12.2021

После доработки 22.04.2022

Принята к публикации 10.06.2022

Received 7 December 2021

Revised 22 April 2022

Accepted 10 June 2022