

УДК 615.076:57.083.138.6:579.887

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-331-346>

Научная статья | Scientific article



## Анализ стабильности стандартного образца тест-штамма *Mycoplasma arginini* G230, используемого при испытании на присутствие микоплазм биологических лекарственных препаратов

С.М. Суханова, З.Е. Бердникова✉, О.В. Фадейкина, Е.М. Петручук, А.С. Тихонова

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Бердникова Зинаида Евтропиевна; [Berdnikova@expmed.ru](mailto:Berdnikova@expmed.ru)

### Резюме

В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) для получения достоверных результатов при проведении испытания лекарственных средств на присутствие микоплазм микробиологическим методом предварительно оценивают пригодность питательной среды с помощью стандартного образца (СО) тест-штамма *Mycoplasma arginini* G230. Стабильность физико-химических свойств и аттестуемой характеристики (титра) СО сохраняется при соблюдении регламентированного температурного режима в течение одного года. Отклонения от указанных условий и транспортирование в условиях окружающей среды могут привести к изменению свойств СО и стать причиной несоответствия качества биологических лекарственных препаратов по показателю «Испытание на присутствие микоплазм». Необходимость проведения исследования не только долгосрочной стабильности материала СО, но и при возможных кратковременных отклонениях от установленных условий хранения подчеркивают и эксперты Комитета по стандартным образцам Международной организации по стандартизации, Государственной системы обеспечения единства измерений, а также Комитета экспертов ВОЗ. **Цель работы:** изучение стабильности стандартного образца тест-штамма *M. arginini* G230 при длительном хранении в регламентируемых условиях и при кратковременном воздействии повышенных температур. **Материалы и методы:** использованы СО тест-штамма *M. arginini* G230 производства ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, питательные среды и растворы по ОФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Стабильность свойств СО, включая аттестуемую характеристику (титр) определяли фармакопейными методами согласно ГФ РФ. Эксперимент проводили в условиях кратковременного воздействия на образцы двух режимов повышенных температур. Контрольные образцы хранили при температуре минус 20±2 °С. Статистическую обработку данных проводили методом предельных разведений по таблице Мак-Креди и рассчитывали среднее арифметическое значение наиболее вероятного числа микроорганизмов (НВЧ) в предельном разведении (титр). **Результаты:** показана стабильность свойств образцов СО, хранившихся в регламентируемых условиях в течение срока, превышающего срок годности (до 16 месяцев). Стабильность основных свойств СО сохраняется после воздействия повышенных температур 25±2 и 37±2 °С в течение 30 сут. Установлено снижение значения аттестованной характеристики (титра) образцов, подвергшихся воздействию температуры 37±2 °С в течение 10 и 30 сут. **Выводы:** показана возможность транспортирования образцов до 30 сут при температуре не выше 25±2 °С без изменения их качества в течение 1 года. Температурный режим 37±2 °С не может быть использован для хранения и/или транспортирования образцов СО.

**Ключевые слова:** тест-штамм *Mycoplasma arginini* G230; отраслевой стандартный образец (ОСО); фармацевтический стандартный образец (ФСО); «short-term stability» (кратковременная стабильность); «stability in transit» (стабильность при транспортировании); контаминация; безопасность лекарственных средств; стабильность; аттестуемая характеристика; условия транспортирования

**Для цитирования:** Суханова С.М., Бердникова З.Е., Фадейкина О.В., Петручук Е.М., Тихонова А.С. Анализ стабильности стандартного образца тест-штамма *Mycoplasma arginini* G230, используемого при испытании на присутствие микоплазм биологических лекарственных препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(3):331–346. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-331-346>

## Stability analysis of the reference standard of *Mycoplasma arginini* strain G230 used for testing biologicals for mycoplasmas

S.M. Sukhanova, Z.E. Berdnikova✉, O.V. Fadeikina, E.M. Petruchuk, A.S. Tikhonova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Zinaida E. Berdnikova; [Berdnikova@expmed.ru](mailto:Berdnikova@expmed.ru)

### Abstract

The State Pharmacopoeia of the Russian Federation (Ph.Rus.) requires a preparatory evaluation of culture medium suitability using the reference standard (RS) of the *Mycoplasma arginini* G230 test strain in order to ensure reliable results when testing medicines for mycoplasmas using a microbiological (culture) method. The RS retains the stability of physico-chemical properties and the certified characteristic value (titre) for one year if stored under the specified temperature conditions ( $-20^{\circ}\text{C}$  to  $-30^{\circ}\text{C}$ ). Deviations from this range and transportation in ambient conditions can alter the properties of the RS and consequently result in biologicals substandard in terms of mycoplasmas. Experts from the Reference Materials Committee of the International Organisation for Standardisation (ISO), the State System for Ensuring the Uniformity of Measurements, and the WHO Expert Committee on Biological Standardisation emphasise the need to study the stability of RSs not only under the specified long-term storage conditions, but also with short-term deviations from such conditions. **The aim of the study** was to analyse the stability of the *M. arginini* G230 test strain RS under the specified long-term storage conditions and with short-term exposure to elevated temperatures. **Materials and methods:** the study used the RS of *M. arginini* G230 by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products and culture media and solutions required per the Ph.Rus. general chapter on mycoplasma tests (OFS.1.7.2.0031.15). The stability of RS's characteristics, including the certified value (titre), was determined using Ph.Rus. methods. The experiment involved two testing regimes with short-term exposure to elevated temperatures. Control samples were stored at  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Statistical data processing was carried out by the serial dilution method using McCrady's table with the calculation of the arithmetic mean of the most probable number (MPN) for the limiting dilution (titre). **Results:** as demonstrated in the study under the specified conditions, the RS retains its characteristics for a period exceeding its shelf life (for up to 16 months). The main characteristics of the RS remain stable after 30-day exposure to elevated temperatures ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  and  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). The certified value (titre) of the RS decreases after exposure to  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$  for 10 and 30 days. **Conclusions:** the study proved the possibility of storing and transporting the RS at a temperature lower than  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  for up to 30 days with no subsequent changes to the quality within the 1-year shelf life. The conditions of  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$  cannot be used for the purpose.

**Key words:** *Mycoplasma arginini* G230 test strain; industry reference material (IRM); pharmacopoeia reference standard (PhRS); short-term stability; stability in transit; contamination; medicinal product safety; stability; certified characteristic; transportation conditions

**For citation:** Sukhanova S.M., Berdnikova Z.E., Fadeikina O.V., Petruchuk E.M., Tikhonova A.S. Stability analysis of the reference standard of *Mycoplasma arginini* strain G230 used for testing biologicals for mycoplasmas. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(3):331–346. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-331-346>

## Введение

Контаминация микоплазмами остается актуальной проблемой для производства биологических лекарственных препаратов (БЛП). Проведение испытаний, подтверждающих отсутствие микоплазм на всех этапах производства БЛП, является обязательным требованием регуляторных органов во всем мире. Оценка рисков микробного загрязнения на всех этапах производства и выявление микоплазм чувствительными методами гарантируют получение безопасных и эффективных лекарственных препаратов. Обнаружение данного вида контаминации и правильная интерпретация результатов требуют, помимо тщательного выполнения всех этапов подготовительных работ, высокого уровня квалификации персонала [1–3].

В настоящее время в соответствии с требованиями международных стандартов испытание на присутствие микоплазм проводят двумя методами: микробиологическим (культуральным) методом и цитохимическим (метод индикаторной клеточной культуры)<sup>1</sup>.

Согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ XIV) испытание микробиологическим методом предусматривает использование питательных сред лабораторного приготовления, чувствительность которых определяют с помощью разработанного и утвержденного в нашей стране в 1980-х гг. отраслевого стандартного образца тест-штамма *Mycoplasma arginini* G230 (СО). Многолетний опыт использования свидетельствует о стабильности свойств СО тест-штамма

*M. arginini* G230, что обеспечивает возможность применения его для оценки качества различных партий питательных сред [4].

Принимая во внимание вариабельность сырья биологического происхождения (триптический гидролизат бычьего сердца, мясной и дрожжевой экстракты, агар микробиологический и др.), входящего в состав питательной среды, возможны ошибки при приготовлении и хранении. Способ оценки ее пригодности с обязательным подтверждением соответствия каждой партии среды установленным требованиям отвечает современным подходам к анализу рисков и позволяет повысить достоверность и сопоставимость результатов испытаний<sup>2</sup> [5].

С 1 июля 2021 г. в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации «О метрологической службе Министерства здравоохранения Российской Федерации в сфере обращения лекарственных средств для медицинского применения»<sup>3</sup> СО тест-штамма *M. arginini* G230 включен в Реестр Фармакопейных стандартных образцов Государственной фармакопеи Российской Федерации под названием «ФСО ГФ РФ Стандартный образец тест-штамма *M. arginini* G230» и реестровым номером ФСО 3.2.00378 (СО 42-28-378)<sup>4</sup>. СО представляет собой лиофилизированную культуру *M. arginini* G230 с гарантированным в течение срока годности значением титра микоплазм. Согласно паспортным данным стабильность значений аттестованной характеристики СО сохраняется в течение срока годности (один год) при соблюдении условий транспортирова-

<sup>1</sup> 2.6.7. Mycoplasmas. European Pharmacopoeia. 10th. ed.; 2018. Общая фармакопейная статья 1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018. <63> Mycoplasma tests. USP 41–NF 36.

<sup>2</sup> Руководства ICH для фармацевтической отрасли. Качество. СПб.: ЦОП «Профессия»; 2017.

<sup>3</sup> Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 20.03.2020 № 202 «О Метрологической службе Министерства здравоохранения Российской Федерации в сфере обращения лекарственных средств для медицинского применения» (вместе с «Положением о Метрологической службе Министерства здравоохранения Российской Федерации в сфере обращения лекарственных средств для медицинского применения»). <https://legalacts.ru/doc/prikaz-minzdrava-rossii-ot-20032020-n-202-o-metrologicheskoi/>

<sup>4</sup> Реестр фармакопейных стандартных образцов Государственной фармакопеи Российской Федерации. [https://www.regmed.ru/content/page/Registry-SPhRS\\_lemma](https://www.regmed.ru/content/page/Registry-SPhRS_lemma)

ния, хранения и порядка применения. Важно отметить, что регламентированным условием хранения СО является температура минус  $20 \pm 2$  °С, а кратковременное хранение и/или транспортирование допускается при температуре от 2 до 8 °С продолжительностью не более 7 сут.

В настоящее время разработчик данного СО выполняет заявки на поставку от организаций, которые находятся в климатических зонах с континентальным климатом, где температура в летние месяцы может подниматься выше 30–35 °С, что значительно превышает допустимые нормы для его хранения и транспортирования. Возможные отклонения температурного режима от регламентированных условий при транспортировании СО в условиях окружающей среды могут стать причиной недостоверной оценки ростовых свойств питательных сред и, как следствие, несоответствия испытания БЛП на присутствие микоплазм. Вместе с тем использование для транспортирования СО специальных контейнеров, поддерживающих необходимый температурный режим, влечет за собой значительное удорожание продукции. Учитывая данные обстоятельства, в настоящее время отгрузка СО осуществляется только самовывозом с указанием соблюдения регламентированных условий, что, очевидно, создает дополнительные сложности для заказчика. В настоящее время частично снизить затраты заказчика при самовывозе возможно при увеличении объема разовой поставки, однако ограничивающим фактором в данном случае будет относительно небольшой установленный регламентированный срок годности образцов СО.

Необходимость решения проблем, связанных с процессом транспортирования СО, послужила основанием для изучения влияния температурного фактора на стабильность свойств СО тест-штамма *M. arginini* G230, что согласуется с рекомендациями документов Комитета по стандартным образцам Международной организации по стандартизации<sup>5</sup>, Государственной системы обеспечения единства измерений<sup>6</sup>, Комитета экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов<sup>7</sup> по проведению исследования стабильности материала СО в условиях возможных

кратковременных отклонений («short-term stability» — кратковременная стабильность), при транспортировании («stability in transit» — стабильность при транспортировании).

Таким образом, расширенное изучение сохранения стабильности свойств и в первую очередь аттестованной характеристики СО тест-штамма *M. arginini* G230 при длительном хранении в регламентируемых условиях и кратковременном хранении при повышенных температурах является своевременным и актуальным.

Цель работы — изучение стабильности стандартных образцов тест-штамма *M. arginini* G230 при длительном хранении в регламентируемых условиях и при кратковременном воздействии повышенных температур.

Задачи исследования:

- проведение ретроспективного анализа свойств СО тест-штамма *M. arginini* G230 при более длительном хранении в регламентированных условиях;
- изучение стабильности свойств СО тест-штамма *M. arginini* G230 при моделировании кратковременного воздействия повышенных температур  $25 \pm 2$  и  $37 \pm 2$  °С;
- оценка возможности изменения условий транспортирования и продления срока годности СО тест-штамма *M. arginini* G230.

## Материалы и методы

### Материалы

Аттестованные СО тест-штамма *M. arginini* G230 (регламентированные условия хранения при температуре от минус 20 °С до минус 30 °С) — 6 серий: сер. 7 (изготовлена 03.2014), сер. 8 (изготовлена 09.2015), сер. 9/1 (изготовлена 04.2017), сер. 9/2 (изготовлена 09.2018), сер. 10 (изготовлена 07.2019), сер. 12 (изготовлена 06.2020).

В соответствии с требованиями ГФ РФ XIV<sup>8</sup> в исследованиях использовали питательные среды лабораторного изготовления (среда Каган жидкая и полужидкая), раствор 0,9% натрия хлорида, а также сыворотку крови лошади производства ООО «Биолот» (Россия) или ООО НПП «ПанЭко» (Россия), имеющие действующий срок годности.

<sup>5</sup> ISO Guide 35:2017. Reference material — General and statistical principles for certification. ISO/TC 334/Ver. 4. 2017.

<sup>6</sup> ГОСТ ISO Guide 35–2015 Стандартные образцы. Общие и статистические принципы сертификации (аттестации).

<sup>7</sup> Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards, Annex 2. TRS No 932. WHO; 2004. Guidelines on stability evaluation of vaccines, Annex 3. TRS No 962. WHO; 2011.

<sup>8</sup> Общая фармакопейная статья 1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

## Оборудование

Результаты получены с применением испытательного оборудования, прошедшего квалификацию/аттестацию:

- термостат ТС-1/20 (СКТБ СПУ, Россия), диапазон: от температуры окружающей среды до 60 °С; класс точности, погрешности:  $\pm 1$  °С;
- термощаф с охлаждением ТС-1/80 (СКТБ СПУ, Россия), диапазон: от 5 до 60 °С; класс точности, погрешности:  $\pm 1,5$  °С;
- термощаф (инкубатор) тип В 115 (Binder GmbH, Швеция), диапазон: от 5 до 100 °С; класс точности погрешности: при 37 °С:  $\pm 0,5$  °С; при 50 °С:  $\pm 1,1$  °С;
- шкаф ламинарный БАВ п-01-1,2 (ЗАО «Ламинарные системы», Россия), класс защиты II;
- морозильная камера Саратов 127 (ООО «СЭПО-ЗЭМ», Россия), температура не выше минус 15 °С.

## Методы

Оценку качества СО по показателям «Описание лиофилизата», «Время растворения» и «Внешний вид растворенного образца» проводили визуальным методом. Наличие вакуума оценивали визуально в поле высокочастотного разряда согласно ГФ РФ XIV<sup>9</sup>.

**Стерильность** образцов определяли методом прямого посева в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV<sup>10</sup>.

**Оценку ростовых свойств питательной среды** проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV ОФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм.

Контроль ростовых свойств полужидкой питательной среды и установление контрольных разведений проводили путем внесения СО из каждого разведения, начиная с последнего ( $10^{-10}$ ), по  $1,0 \pm 0,1$  мл в 2–3 пробирки с 10 мл среды и инкубирования при температуре  $37 \pm 1$  °С в течение 7 сут. По окончании инкубирования определяли разведения, в которых выявляли около  $10$ – $100$  КОЕ тест-штамма *M. arginini* G230 и устанавливали их в качестве контрольных разведений. Среда признавали годной, если не позднее 7 сут инкубации визуально обнаруживали рост тест-штамма *M. arginini* G230 в разведении не ниже  $10^{-6}$  при посеве  $10$ – $100$  КОЕ.

**Определение значения аттестуемой характеристики (титр).** Значение титра (аттестуемая характеристика) СО тест-штамма *M. arginini*

G230 (КОЕ/мл) определяли методом десятикратных разведений с последующим высевом каждого разведения в три пробирки на полужидкую питательную среду и инкубированием посевов при температуре  $37 \pm 1$  °С в течение не более 7 сут. Учет результатов проводили на 7 сут путем визуального просмотра пробирок в прямом проходящем свете, обнаруживая наличие в зоне посева колонии микоплазм в виде беловатых полупрозрачных округлых образований или тонкой паутинки или облачков. Фиксировали контрольное разведение, в котором отмечали рост микоплазм, принимая его за значение титра.

Расчет титра проводили методом предельных разведений с составлением числовой характеристики по таблице Мак-Креди<sup>11</sup>. В таблице 1 выборочно представлены примеры для наиболее часто встречающихся числовых характеристик при экспресс-обработке результатов учета микроорганизмов по методу предельных разведений (таблица Мак-Креди). Числовая характеристика согласно данной таблице формируется из трех цифр (слева направо): первая цифра соответствует числу пробирок с ростом микоплазм, взятых в том наименьшем разведении, в котором микоплазмы выросли во всех пробирках (например, три

**Таблица 1.** Пример экспресс-обработки результатов учета микроорганизмов по методу предельных разведений (таблица Мак-Креди выборочно)

**Table 1.** An example of rapid processing of the results of microorganism quantification using the most probable number method (McCready's table with omissions)

Числовая характеристика (наиболее часто встречающаяся) <i>Numerical characteristic (most common)</i>	Наиболее вероятное число (НВЧ) микроорганизмов при посеве в 3 пробирках <i>Most probable number (MPN) of microorganisms when inoculated in three test tubes</i>
300	2,5
310	4,5
311	7,5
321	15,0
322	20,0
330	25,0
331	4,5
333	140,0

<sup>9</sup> Общая фармакопейная статья 1.7.1.0018.18 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т 2; 2018.

<sup>10</sup> Общая фармакопейная статья 1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

<sup>11</sup> ГОСТ 54653-2011 Удобрения органические. Методы микробиологического анализа.



пробирки из разведения  $10^{-6}$ ). Следующие две цифры обозначают число пробирок с ростом микоплазм в двух последующих разведениях (например, в двух пробирках из трех разведений  $10^{-7}$  и в одной пробирке из разведения  $10^{-8}$ ). Числовая характеристика результата в таком случае составляет 321. По таблице Мак-Креди находили наиболее вероятное число (НВЧ), соответствующее полученной цифровой характеристике (в нашем примере 15), умножали его на разведение, которому соответствует первая

цифра числовой характеристики (в нашем примере  $15,0 \times 10^6$  или  $1,5 \times 10^7$ ).

Определение титра СО *M. arginini* G230 по таблице Мак-Креди на примере серии 8 представлено в таблице 2.

**Влияние кратковременного воздействия повышенных температур.** Изучение проводили на 3 сериях СО согласно требованиям ГФ РФ XIV по двум схемам: полная (для серии 9/2) – моделирование кратковременного воздействия двух температурных режимов:  $25 \pm 2$  и  $37 \pm 2$  °С

**Таблица 2.** Пример учета первичных данных и определения титра стандартного образца *M. arginini* G230 (серия 8) по таблице Мак-Креди

**Table 2.** An example of primary data processing and *M. arginini* G230 RS (batch 8) titre determination using McCrady's table

№ пробирки <i>Test tube number</i>	Разведение <i>Dilution</i>	Наличие роста штамма <i>M. arginini</i> G230 на 7 сут инкубирования при посеве в трех параллельных пробирках (ампулы А1–А5) <i>Growth of M. arginini strain G230 inoculated in three parallel test tubes (ampoules A1–A5) on incubation day 7</i>				
		A1	A2	A3	A4	A5
1	$10^{-1}$	+++	+++	+++	+++	+++
2	$10^{-2}$	+++	+++	+++	+++	+++
3	$10^{-3}$	+++	+++	+++	+++	+++
4	$10^{-4}$	+++	+++	+++	+++	+++
5	$10^{-5}$	+++	+++	+++	+++	+++
6	$10^{-6}$	+++	+++	+++	+++	+++
7	$10^{-7}$	+++	+++	+++	+++	+++
8	$10^{-8}$	+++	+++	+-	+-	+++
9	$10^{-9}$	---	---	---	---	---
10	$10^{-10}$	---	---	---	---	---
Полученные данные и расчет НВЧ <i>Obtained data and MPN calculation</i>						
Предельное разведение, в котором обнаружен рост микоплазм <i>Highest dilution with mycoplasma growth</i>		$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
Числовая характеристика по таблице Мак-Креди <i>Numerical characteristic as per McCrady's table</i>		300	300	310	310	300
НВЧ микроорганизмов при посеве в трех пробирках, КОЕ/мл <i>MPN of microorganisms when inoculated in three test tubes, CFU/mL</i>		$2,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$	$0,45 \times 10^8$	$0,45 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
Среднее арифметическое значение НВЧ микроорганизмов, КОЕ/мл <i>Arithmetic mean of MPNs of the microorganisms, CFU/mL</i>		$1,7 \times 10^8$				

**Примечание.** «+» наличие роста микоплазм; «-» отсутствие роста микоплазм. НВЧ – наиболее вероятное число, КОЕ – колониобразующие единицы.

**Note.** + growth of mycoplasmas; - no growth of mycoplasmas. MPN—most probable number, CFU—colony-forming unit.

и сокращенная (для серий 10 и 12) – моделирование кратковременного воздействия температуры  $25 \pm 2$  °C.

Образцы СО, хранившиеся в регламентированных условиях до и после воздействия повышенных температур, считали прошедшими испытание, если значение титра соответствовало требованиям спецификации и было не ниже  $10^7$  КОЕ/мл.

**Полная схема.** Образцы СО в начале срока годности выдерживали при четырех термовременных режимах: при  $25 \pm 2$  °C в течение 10 и 30 сут и аналогично при  $37 \pm 2$  °C, а затем исследовали их в два этапа.

На 1-м этапе половину образцов анализировали непосредственно по истечении каждого периода температурного воздействия по показателям согласно спецификации (по 4 ампулы СО на каждом этапе).

На 2-м этапе аналогично исследовали вторую половину образцов СО, которую после воздействия двух режимов повышенных температур (10 и 30 сут) хранили в регламентированных условиях при температуре минус  $20 \pm 2$  °C до истечения срока годности.

Контрольными образцами в испытаниях служили образцы, хранившиеся в течение всего срока годности в регламентированных условиях при температуре минус  $20 \pm 2$  °C (контрольные образцы) (рис. 1).

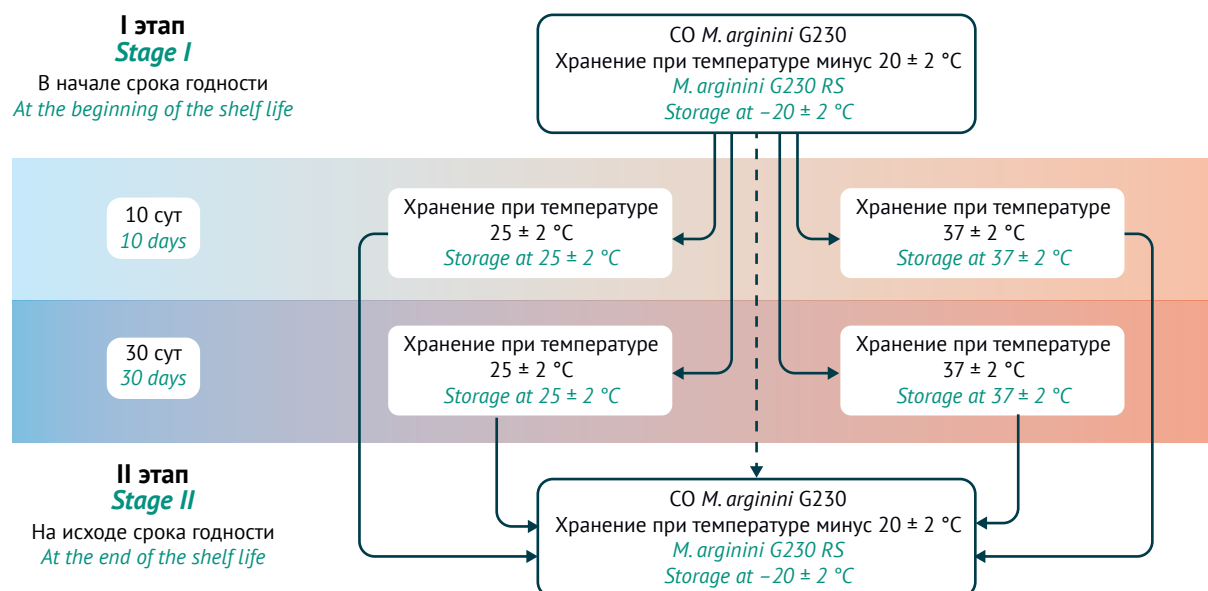
**Сокращенная схема.** Образцы СО серий 10 и 12 (по 6 ампул каждой серии) выдерживали при температуре  $25 \pm 2$  °C в течение 30 сут, затем хранили при температуре минус  $20 \pm 2$  °C до истечения срока годности и далее проводили исследование в сравнении с контрольными образцами.

**Критерии приемлемости результатов.** При интерпретации результатов, учитывая особенность методики, обусловленную вариабельностью компонентов среды, числовые значения коэффициента титра, рассчитанные по таблице Мак-Креди (например,  $1,1 \times 10^7$ ,  $0,8 \times 10^7$ ) и находящиеся в пределах одного порядка, принимали как сопоставимые, а последующий анализ проводили, принимая во внимание только значения контрольных разведений ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ), без учета коэффициента.

**Статистическая обработка результатов.** Рассчитывали среднее арифметическое значение ( $\bar{X}_{cp}$ ) наиболее вероятного числа (НВЧ) микроорганизмов; стандартное отклонение (S) результатов определения НВЧ микроорганизмов [6].

## Результаты и обсуждение

Для проведения исследования использовали аттестованные серии СО тест-штамма *Mycoplasma arginini* G230, отвечающие требованиям спецификации по всем показателям. Аттестацию проводили в соответствии с общими



**Рис. 1.** Полная схема исследования влияния повышенных температур на стандартный образец (СО) тест-штамма *M. arginini* G230 (серия 9/2).

**Fig. 1.** The complete scheme of the study of elevated temperature effects on the reference standard (RS) of *M. arginini* G230 (batch 9/2).

**Таблица 3.** Требования к качеству стандартного образца тест-штамма *M. arginini* G230

**Table 3.** Quality requirements for the reference standard of the *M. arginini* G230 test strain

Показатель <i>Parameter</i>	Метод <i>Method</i>	Норма <i>Requirement</i>
Описание (внешний вид) лиофилизата <i>Description (appearance) before reconstitution</i>	Визуальный <i>Visual</i>	Лиофилизированная мелкопористая масса светло-желтого цвета в виде рыхлой таблетки <i>Light-yellow finely porous lyophilised mass in the form of a friable tablet</i>
Наличие вакуума (герметизация) <i>Presence of vacuum (Container closure integrity)</i>	Визуальный ГФ РФ XIV ОФС.1.8.1.0002.15 Иммунобиологические лекарственные препараты <i>Visual</i> <i>Ph.Rus. 14, OFS.1.8.1.0002.15 Immunobiological medicinal products</i>	Наличие вакуума в ампулах проверяют в поле высокочастотного разряда. Свечение ампул должно быть голубым или розово-голубым <i>Ampoules are checked for vacuum in a high-voltage high-frequency field. The glow is blue or pink-blue</i>
Растворимость Время растворения <i>Solubility</i> <i>Reconstitution time</i>	Визуальный <i>Visual</i>	Время растворения в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида не должно превышать 1 мин <i>Reconstitution time in sterile 0.9% sodium chloride is less than 1 min</i>
Описание растворенного образца <i>Description after reconstitution</i>	Визуальный <i>Visual</i>	Суспензия светло-желтого цвета без осадка и примесей <i>Light-yellow suspension free of sediment and impurities</i>
Стерильность <i>Sterility</i>	Метод прямого посева ГФ РФ XIV ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность <i>Direct inoculation</i> <i>Ph.Rus. 14, OFS.1.2.4.0003.15.Sterility</i>	Бактерии и грибы должны отсутствовать <i>No bacteria and fungi are present</i>
Потеря в массе при высушивании, % <i>Loss on drying, %</i>	Весовой ГФ РФ XIV ОФС.1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании <i>Weighing</i> <i>Ph.Rus. 14, OFS.1.2.1.0010.15 Loss on drying</i>	Не более 3 <i>Not more than 3</i>
Аттестуемая характеристика (титр), КОЕ/мл <i>Certified value (titre), CFU/mL</i>	Расчет титра методом предельных разведений с составлением числовой характеристики по таблице Мак-Креди или по среднему арифметическому значению <i>Titre calculation by the most probable number method involving numerical characterisation using McCrady's table or the arithmetic mean</i>	Не ниже $1 \times 10^7$ <i>Not less than <math>1 \times 10^7</math></i>

*Примечание.* ГФ РФ XIV – Государственная фармакопея Российской Федерации (XIV изд.), ОФС – общая фармакопейная статья, КОЕ – колониеобразующая единица.

*Note.* Ph.Rus. 14 – State Pharmacopoeia of the Russian Federation (14 ed.), OFS – general chapter identifier, CFU – colony-forming unit.

подходами, принятыми в области разработки стандартных образцов биологических лекарственных средств, по показателям: «Описание лиофилизата», «Наличие вакуума», «Время растворения», «Описание растворенного образца», «Стерильность», «Аттестуемая характеристика (титр)» [7, 8]. Основные характеристики и требования к качеству СО тест-штамма *M. arginini* G230 представлены в таблице 3.

Наш многолетний (более 30 лет) опыт использования и изучения СО тест-штамма *M. arginini* G230 (более 40 серий) свидетельствует об устойчивой стабильности его свойств при соблюдении установленных условий хранения и транспортирования образцов в течение регламентированного срока годности (12 мес.).

Для решения задачи по установлению возможности увеличения срока годности проводили ретроспективный анализ стабильности основных свойств и аттестованной характеристики СО тест-штамма *M. arginini* G230. Были изучены данные по трем аттестованным сериям СО, хранившимся в регламентированных условиях в течение срока, превышающего установленный срок годности (до 2 лет и более). Установлено, что при хранении образцов в регламентированных условиях и при более длительном хранении изменений свойств или отклонений по основным показателям качества не происходит. Образцы СО соответствуют установленным критериям и представляют собой лиофилизированную массу в виде рыхлой таблетки светло-желтого



**Таблица 4.** Рост тест-штамма *M. arginini* G230 в контрольном разведении при контроле ростовых свойств партий питательных сред (2014–2019 гг.)

**Table 4.** Growth of *M. arginini* test strain G230 in the control dilution, observed when monitoring growth promoting properties of culture media batches (2014–2019)

№ серии CO <i>RS batch number</i>	Дата учета результата испытания <i>Test result calculation date</i>	№ партии питательной среды <i>Culture medium lot number</i>	Рост тест-штамма <i>M. arginini</i> G230 в контрольном разведении <i>Growth of M. arginini strain G230 in the control dilution</i>	Соответствует / не соответствует <i>Compliant / non-compliant</i>
Серия 7, срок наблюдения 17 мес. (изг. 03.2014) <i>Batch 7, 17 months of observation (mfd. 03.2014)</i>				
2014 г.				
7	03.2014 (аттестация) <i>(certification)</i>	ПС/292/03/14	10 <sup>-8</sup>	Соответствует <i>Compliant</i>
7	04.2014	ПС/334/04/14	10 <sup>-7</sup>	Соответствует <i>Compliant</i>
7	05.2014	ПС/418/05/14	10 <sup>-7</sup>	Соответствует <i>Compliant</i>
7	12.2014	ПС/270/10/14	10 <sup>-7</sup>	Соответствует <i>Compliant</i>
2015 г.				
7	02.2015	ПС/30/02/15	10 <sup>-7</sup>	Соответствует <i>Compliant</i>
7	03.2015	ПС/89/02/15	10 <sup>-7</sup>	Соответствует <i>Compliant</i>
7	04.2015	ПС/113/03/15	10 <sup>-7</sup>	Соответствует <i>Compliant</i>
7	08.2015	ПС/377/08/15	10 <sup>-7</sup>	Соответствует <i>Compliant</i>
Серия 8, срок наблюдения 18 мес. (изг. 09.2015) <i>Batch 8, 18 months of observation (mfd. 09.2015)</i>				
8	09.2015 (аттестация) <i>(certification)</i>	ПС/01/09/15	10 <sup>-7</sup>	Соответствует <i>Compliant</i>
2016 г.				
8	06.2016	ПС/18/л/06/16	10 <sup>-7</sup>	Соответствует <i>Compliant</i>
8	08.2016	ПС /117/л/08/16	10 <sup>-7</sup>	Соответствует <i>Compliant</i>
8	12.2016	ПС/299/л/12/16	10 <sup>-6</sup>	Соответствует <i>Compliant</i>
2017 г.				
8	03.2017	ПС/430/л/03/17	10 <sup>-8</sup>	Соответствует <i>Compliant</i>
8	03.2017	ПС/431/л/03/17	10 <sup>-8</sup>	Соответствует <i>Compliant</i>
Серия 9/1, срок наблюдения: 28 мес. (изг. 04.2017) <i>Batch 9/1, 28 months of observation (mfd. 04.2017)</i>				
9/1	05.2017 (аттестация) <i>(certification)</i>	ПС/32/л/05/17	10 <sup>-7</sup>	Соответствует <i>Compliant</i>

Продолжение таблицы 4  
Table 4 (continued)

№ серии СО RS batch number	Дата учета результата испытания Test result calculation date	№ партии питательной среды Culture medium lot number	Рост тест-штамма <i>M. arginini</i> G230 в контрольном разведении Growth of <i>M. arginini</i> strain G230 in the control dilution	Соответствует / не соответствует Compliant / non-compliant
2018 г.				
9/1	05.2018	ПС/159/л/05/ 18	$10^{-7}$	Соответствует Compliant
9/1	11.2018	ПС/456/л/11/18	$10^{-8}$	Соответствует Compliant
9/1	04.2018	ПС/143/л/04/ 18	$10^{-7}$	Соответствует Compliant
2019 г.				
9/1	04.2019	ПС/163/л/03/19	$10^{-7}$	Соответствует Compliant
9/1	06.2019	ПС/294/л/06/19	$10^{-7}$	Соответствует Compliant
9/1	07.2019	ПС/294/л/06/19	$10^{-8}$	Соответствует Compliant
9/1	08.2019	ПС/333/л/07/19	$10^{-7}$	Соответствует Compliant

Примечание. СО — стандартный образец.  
Note. RS—reference standard.

цвета. Наличие вакуума в ампулах сохраняется. После растворения образцы представляют собой суспензию светло-желтого цвета, время растворения не превышает 1 мин, посторонние бактерии и грибы отсутствуют.

Результаты определения значения аттестованной характеристики (рост в контрольном разведении) (табл. 4), свидетельствуют, что значения титра образцов трех изученных серий СО тест-штамма *M. arginini* G230, полученные на разных партиях питательных сред, также соответствуют установленным требованиям спецификации и сохраняются в пределах не ниже  $10^7$  КОЕ/мл в течение срока, превышающего установленный срок годности (серия 7 — 17 мес., серия 8 — 18 мес., серия 9/1 — 28 мес.).

Таким образом, данные по анализу качества по показателям спецификации и значению титра образцов трех серий СО тест-штамма *M. arginini* G230, хранившихся в регламентированных условиях, позволяют сделать вывод об устойчивой стабильности свойств СО по всем показателям качества в течение срока, превышающего срок годности (до 16 мес.).

На следующем этапе работы было проведено изучение стабильности свойств СО тест-штамма *M. arginini* G230 при возможных отклонениях температуры от регламентированной при транспортировании в условиях окружающей среды.

Условия моделировали кратковременным воздействием двух режимов повышенных температур:  $25 \pm 2$  и  $37 \pm 2$  °С.

В качестве объекта использовали образцы трех аттестованных серий (сер. 9/2, 10 и 12) СО тест-штамма *M. arginini* G230 с титром не ниже  $1 \times 10^7$  КОЕ/мл в каждой из указанных серий.

Анализ соответствия качества образцов после воздействия температуры  $25 \pm 2$  °С в течение 10 и 30 сут (серия 9/2) и образцов серий 10 и 12 в течение 30 сут по показателям: «Описание лиофилизата», «Время растворения», «Описание растворенного образца», «Стерильность», «Наличие вакуума», полученных как в начале срока годности (1-й этап), так и в конце срока годности (2-й этап), показал сохранение стабильности основных свойств СО. Образцы всех исследованных серий, подвергнутые воздействию температурного режима  $25 \pm 2$  °С в течение 30 сут, соответствовали требованиям спецификации в конце установленного срока годности и представляли собой лиофилизированную массу светло-желтого цвета в виде рыхлой таблетки, герметизированную в вакуумированных ампулах. Время растворения в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида не превышало 1 мин. Растворенные образцы представляли собой суспензию светло-желтого цвета. Посторонние бактерии и грибы обнаружены не были. Результаты определения значения

**Таблица 5.** Результаты влияния повышенных температур на значение аттестованной характеристики стандартного образца тест-штамма *M. arginini* G230**Table 5.** The effects of elevated temperatures on the value of the certified characteristic of the *M. arginini* G230 test strain RS

№ серии (титр при аттестации), количество ам- пул в испытании/ дата учета <i>Batch No. (titre at the time of certification), number of tested ampoules/ calculation date</i>	Температура хранения образцов СО, °С <i>RS samples storage t, °C</i>	Титр образцов СО тест-штамма <i>M. arginini</i> G230, ( $\bar{X}_{cp} \pm S$ ), НВЧ/мл, хранение при повышенных температурах в течение <i>Titre of M. arginini G230 RS samples, (<math>\bar{X}_{mean} \pm S</math>), MPN/mL, stored at elevated temperatures during</i>			
		10 сут <i>10 days</i>		30 сут <i>30 days</i>	
		при испытании <i>when tested</i>			
		в начале срока годности (01.10.2018) <i>at the beginning of the shelf life (01.10.2018)</i>	в конце срока годности (28.08.2019) <i>at the end of the shelf life (28.08.2019)</i>	в начале срока годности (22.10.2018) <i>at the beginning of the shelf life (22.10.2018)</i>	в конце срока годности <i>at the end of the shelf life</i>
9/2 (10 <sup>7</sup> КОЕ/мл) <i>(10<sup>7</sup> CFU/mL)</i> <i>n=4/</i> 01.09.2018	25±2	(1,1±0,7)×10 <sup>7</sup>	(3,0±0,6)×10 <sup>7</sup>	(1,1±0,6)×10 <sup>7</sup>	<sup>a</sup> (3,5±1,4)×10 <sup>7</sup>
	37±2	(0,8±0,6)×10 <sup>6</sup>	(3,1±1,2)×10 <sup>6</sup>	(0,6±0,3)×10 <sup>6</sup>	<sup>a</sup> (3,0±1,7)×10 <sup>6</sup>
	–20±2 (контроль) <i>(control)</i>	>10 <sup>7</sup>	>10 <sup>7</sup>	>10 <sup>7</sup>	<sup>a</sup> >10 <sup>7</sup>
10 (10 <sup>7</sup> КОЕ/мл) <i>(10<sup>7</sup> CFU/mL)</i> <i>n=6/</i> 23.07.2019	25±2	–	–	–	<sup>b</sup> (0,8±0,3)×10 <sup>7</sup>
	–20±2 (контроль) <i>(control)</i>	–	–	–	<sup>b</sup> >10 <sup>7</sup>
12 (10 <sup>7</sup> КОЕ/мл) <i>(10<sup>7</sup> CFU/mL)</i> <i>n=6/</i> 19.06.2020	25±2	–	–	–	<sup>c</sup> (3,1±1,6)×10 <sup>7</sup>
	–20±2 (контроль) <i>(control)</i>	–	–	–	<sup>c</sup> >10 <sup>7</sup>

Примечание. «–» – испытание не предусмотрено. СО – стандартный образец, НВЧ – наиболее вероятное число, КОЕ – колониобразующие единицы.

<sup>a</sup> Дата учета результата (для серии 9/2) – 28.08.2019.

<sup>b</sup> Дата учета результата (для серии 10) – 20.07.2020.

<sup>c</sup> Дата учета результата (для серии 12) – 14.06.2021.

Note. – not applicable, RS–reference standard, MPN–most probable number, CFU–colony-forming unit.

<sup>a</sup> Calculation date: 28 August 2019.

<sup>b</sup> Calculation date: 20 July 2020.

<sup>c</sup> Calculation date: 14 June 2021.

титра образцов серии 9/2 в начале и в конце срока годности, а также образцов серий 10 и 12 по истечении срока годности после воздействия температуры 25±2 °С в течение 30 сут (табл. 5) наглядно демонстрируют, что значения титра образцов сохраняются в течение регламентированного срока годности в пределах, установленных при аттестации (не ниже 10<sup>7</sup> КОЕ/мл) и свидетельствуют об отсутствии значимого влияния данного термовременного режима на жизнеспособность и титр микоплазм.

Анализ результатов оценки качества образцов СО серии 9/2 после воздействия второго

температурного режима 37±2 °С в течение 10 и 30 сут также показал отсутствие изменений свойств по показателям спецификации, все образцы соответствовали установленным требованиям, за исключением значения аттестованной характеристики. При проведении анализа воздействия данного режима на значение титра было установлено отклонение от нормативных требований. В частности, хранение образцов серии 9/2 при температуре 37±2 °С в течение 10 и 30 сут существенно повлияло на жизнеспособность микоплазм и привело к снижению титра (до 10<sup>6</sup> КОЕ/мл), что на порядок ниже зна-

чения ( $1,0 \times 10^7$  КОЕ/мл), полученного при аттестации в начале срока годности СО. Учитывая, что при дальнейшем хранении в регламентированных условиях значение титра СО во всех испытаниях сохранялось ( $10^6$  КОЕ/мл), можно предположить, что потеря жизнеспособности микроорганизмов произошла непосредственно в течение первых десяти суток после воздействия повышенной температуры  $37 \pm 2$  °С.

На основании полученных результатов о негативном влиянии данного термовременного режима на титр СО серии 9/2 дальнейшее продолжение исследований по полной схеме на образцах двух других серий (10 и 12) было признано нецелесообразным.

Таким образом, изучение стабильности СО тест-штамма *M. arginini* G230 при моделировании кратковременного воздействия повышенных температур показало, что основные свойства и титр СО тест-штамма *M. arginini* G230 сохраняются после воздействия температуры  $25 \pm 2$  °С в течение 30 сут, что позволяет без потери качества транспортировать СО в указанных условиях и использовать его при соблюдении регламентированных условий хранения до окончания установленного срока годности. Вместе с тем воздействие в течение 10 сут более высокой температуры  $37 \pm 2$  °С приводит к существенному снижению титра СО и не может рассматриваться в качестве допустимого режима хранения и/или транспортирования.

## Литература/References

1. Volokhov DV, Graham LJ, Brorson KA, Chizhikov VE. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: review of alternative non-microbiological techniques. *Mol Cell Probes*. 2011;25(2-3):69-77. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2011.01.002>
2. Fratz-Berilla EJ, Angart P, Graham RJ, Powers DN, Mohammad A, Kohnhorst C, et al. Impacts on product quality attributes of monoclonal antibodies produced in CHO cell bioreactor cultures during intentional mycoplasma contamination events. *Biotechnol Bioeng*. 2020;117(9):2802-15. <https://doi.org/10.1002/bit.27436>
3. Olarerin-George AO, Hogenesch JB. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq archive. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(5):2535-42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv136>
4. Суханова СМ, Бердникова ЗЕ, Тихонова АС. Совершенствование методики оценки качества питательной среды для выявления микоплазм. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(3):161-8. [Sukhanova SM, Berdnikova ZE, Tikhonova AS. Ways to improve quality control of culture medium used for mycoplasma

## Выводы

1. Ретроспективный анализ СО тест-штамма *M. arginini* G230, используемого для оценки пригодности питательной среды, показал, что при соблюдении регламентированных условий хранения и транспортирования стабильность свойств сохраняется в течение срока, превышающего срок годности (до 16 мес.).
2. Установлено, что воздействие на образцы СО температурного режима  $37 \pm 2$  °С в течение 10 и 30 сут приводит к снижению аттестованного значения (титра) образцов, не позволяющего в дальнейшем использовать его для оценки качества питательной среды при испытании БЛП на присутствие микоплазм.
3. Экспериментально показано, что хранение образцов трех серий при температуре  $25 \pm 2$  °С не влияет на свойства СО тест-штамма *M. arginini* G230 и позволяет его использовать в течение установленного срока годности после транспортирования не более 30 сут при данной температуре.
4. Целесообразно продолжение исследований по изучению стабильности свойств образцов СО, подвергшихся воздействию в течение 30 сут температуры  $25 \pm 2$  °С, после истечения регламентированного срока годности для одновременного решения вопросов, касающихся увеличения срока годности и возможности транспортирования СО при данном термовременном режиме.

detection. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(3):161-8 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-3-161-168>

5. Суханова СМ, Захарова НЕ. Питательные среды в фармакопейном анализе: применение, действующие требования, вопросы стандартизации. *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(3):136-44. [Sukhanova SM, Zakharova NE. Culture media in pharmacopoeial analysis: use, current requirements, standardisation. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(3):136-44 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-3-136-144>
6. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика; 1998. [Glantz SA. *Primer of biostatistics*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1994]
7. Фадейкина ОВ, Волкова РА. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017;51(8):44-50. [Fadeykina OV, Volkova RA. Elaboration of certification procedures for reference standards of biological drugs.

*Khimiko-farmatsefticheskii zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2017;51(8):716–21] <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-8-44-50>

8. Бондарев ВП, Борисевич ИВ, Волкова РА, Фадейкина ОВ. Проблемы аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов. *Ведомости Научного центра экспертизы*

*средств медицинского применения.* 2013;2:28–32. [Bondarev VP, Borisevich IV, Volkova RA, Fadeikina OV. Industry reference standards certification for the control of medical immunobiological preparations. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = Scientific Center for Expertise of Medical Application Products Bulletin.* 2013;2:28–32 (In Russ.)]

**Вклад авторов.** С.М. Суханова — анализ и интерпретация результатов, критическое обсуждение текста рукописи, формулировка выводов, редактирование и переработка рукописи; З.Е. Бердникова — выполнение экспериментальных работ, написание текста, критическое обсуждение и редактирование рукописи; О.В. Фадейкина — планирование исследования, концепция и дизайн исследования влияния повышенных температур, обобщение экспериментальных данных, анализ и интерпретация результатов, статистическая обработка результатов, написание текста рукописи; Е.М. Петручук — выполнение экспериментальных работ, статистическая обработка результатов исследований; А.С. Тихонова — редактирование рукописи, работа с табличным и иллюстративным материалом.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

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

**Authors' contribution.** S.M. Sukhanova—analysis and interpretation of the results, critical revision of the text of the manuscript, formulation of the conclusions, editing and reshaping of the manuscript; Z.E. Berdnikova—execution of the experiments, writing of the text, critical revision and editing of the manuscript; O.V. Fadeikina—planning of the study, elaboration of the concept and design of the study investigating the effects of elevated temperatures, consolidation of the experimental data, analysis and interpretation of the results, statistical processing of the results, writing of the text of the manuscript; E.M. Petruchuk—execution of the experiments, statistical analysis of the study results; A.S. Tikhonova—editing of the manuscript, preparation of the tabular and illustrative material.

**Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project № 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## Об авторах / Authors

Суханова Светлана Михайловна, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6621-4384>

[suhanovasm@expmed.ru](mailto:suhanovasm@expmed.ru)

Бердникова Зинаида Евтропиевна, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9865-4250>

[berdnikova@expmed.ru](mailto:berdnikova@expmed.ru)

Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

[fadeikina@expmed.ru](mailto:fadeikina@expmed.ru)

Петручук Елена Медатовна, канд. биол. наук. ORCID:

<https://orcid.org/0000-0002-7893-4933>

[petruchuk@expmed.ru](mailto:petruchuk@expmed.ru)

Тихонова Александра Сергеевна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7281-1249>

[tikhonova@expmed.ru](mailto:tikhonova@expmed.ru)

Svetlana M. Sukhanova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID:

<https://orcid.org/0000-0001-6621-4384>

[suhanovasm@expmed.ru](mailto:suhanovasm@expmed.ru)

Zinaida E. Berdnikova, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9865-4250>

[berdnikova@expmed.ru](mailto:berdnikova@expmed.ru)

Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

[fadeikina@expmed.ru](mailto:fadeikina@expmed.ru)

Elena M. Petruchuk, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7893-4933>

[petruchuk@expmed.ru](mailto:petruchuk@expmed.ru)

Aleksandra S. Tikhonova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7281-1249>

[tikhonova@expmed.ru](mailto:tikhonova@expmed.ru)

Поступила 08.12.2021

После доработки 19.08.2022

Принята к публикации 26.08.2022

Received 8 December 2021

Revised 19 August 2022

Accepted 26 August 2022