DOI <http://dx.doi.org/10.18551/rjoas.2016-09.13>

**ИССЛЕДОВАНИЕ НА СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ
РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ АНТИОКСИДАНТНОГО ПРЕПАРАТА**
GENOTOXICITY STUDY OF DIFFERENT DOSES OF THE ANTIOXIDANT PREPARATION
ON SOMATIC CELLS

Легоцкая Т.Н.*, соискатель

Legotskaia T.N., Post-graduate student

Тухфатова Р.Ф., кандидат биологических наук

Tuhfatova R.F., Candidate of Veterinary Sciences

**ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и
биотехнологии – МВА имени К.И.Скрябина», Москва, Россия**

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State
Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA named after K.I. Skryabin»,
Moscow, Russia

*E-mail: t.legotskaia@gmail.com

АННОТАЦИЯ

Проведено изучение *in vivo* генотоксического действия различных доз антиоксидантного, антигипоксанта препарата «Эмидонол 5%» на соматические клетки паренхиматозных органов. Исследования проведены на 30 лабораторных мышках линии BALB/C со средней живой массой 18-20 грамм. Животным экспериментальных групп вводили однократно препарат в терапевтической и десятикратной терапевтической дозах, животным из контрольных групп вводили однократно воду для инъекций. Экспозиция препарата *in vivo* для различных групп составила 4 и 12 часов. Регистрацию повреждений ДНК и оценку генотоксического действия препарата проводили щелочным вариантом метода ДНК-комет. Установлено, что в экспериментальных группах наблюдалось увеличение повреждения ДНК в сравнении с контрольными группами. Однако при введении препарата в рекомендуемой терапевтической дозе не происходили значительные повреждения ДНК соматических клеток. При десятикратном повышении дозы препарата «выход» ДНК в «хвост кометы» увеличивался и имел тенденцию к уменьшению при более длительной экспозиции.

ABSTRACT

The genotoxicity of different doses of the antioxidant and antihypoxants drug «Emidonolum 5%» in somatic cells of parenchymal organs was evaluated *in vivo*. In this research were involved 30 laboratory BALB/C line mice with the average live weight of 18-20 grams. Experimental groups of mice were exposed to two different concentrations of the "Emidonolum 5%": therapeutic dose and tenfold therapeutic dose. For control groups was once administrated water for injection. Drug exposure *in vivo* for various groups was 4 and 12 hours. Evaluation of DNA damage and genotoxicity was carried out using single cell gel electrophoresis at high pH. During the study in experimental groups was observed increase of DNA damage compared to negative control groups. However the administration of recommended therapeutic dose was not cause significant increase of DNA damage in somatic cells. The administration of tenfold therapeutic dose significant raised the level of DNA in a «tail of comet». This effect tended to decrease with longer exposure.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Антиоксидант, метод ДНК-комет, генотоксичность, клетки.

KEY WORDS

Antioxidant, DNA comet method, genotoxicity, cells.

В результате аэробного дыхания и процессов метаболизма, организмом вырабатываются реактивные формы химических веществ, необходимые для поддержания биохимических и физиологических процессов. Они участвуют в поддержании клеточного гомеостаза во время апоптоза [1], в клеточной противомикробной защите во время фагоцитоза и нетоза [2,3,26] и во многих других процессах. Под действием патологических факторов (инфекции, чрезмерные нагрузки, токсические вещества, пестициды и пр.) происходит чрезмерное образование реактивных форм [4,5], что может приводить к дисбалансу между их выработкой и разрушением, вызывая окислительный [6] или нитрозирующий стресс [7], ведущие к повреждению или гибели клеток [8].

С момента обнаружения повреждающего действия реактивных соединений кислорода на клетки организма животных и человека [9–11] опубликовано обширное количество исследований, связывающих процессы выработки реактивных форм и перекисного окисления биологических мембран с патогенезом многочисленных заболеваний человека и животных [12–15]. В связи с этим возрос интерес к поиску и исследованию веществ, инактивирующих чрезмерно выработанные реактивные формы. К таким веществам относятся эндогенные и экзогенные соединения, обладающие антиоксидантной активностью. На фоне роста популярности антиоксидантов началось их неконтролируемое использование. Это вызвало научный интерес и в результате были опубликованы работы, в которых говорится, что в некоторых случаях антиоксиданты могут действовать как прооксиданты, инициируя образование радикалов и активируя перекисное окисление биологически важных клеточных макромолекул [16,17]. Показано, что это может приводить к модификации структуры ДНК, например, к повреждению оснований, индуцированию одно- и двунитевых разрывов и образованию межнитевых сшивок [4,18]. Согласно рекомендациям ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения России, при проведении доклинических исследований фармакологических препаратов проводят оценку их генотоксического риска [19]. В связи с этим целью работы являлось изучение возможного генотоксического действия различных доз препарата «Эмидонол 5%» при различных экспозициях *in vivo* на соматические клетки животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование проведено на 30 белых лабораторных мышах линии BALB/C с живой массой 18-20 г. Было сформировано по принципу групп-аналогов по полу, возрасту, средней живой массе и фенотипическим признакам 6 групп, по 5 животных в каждой: 4 экспериментальных и 2 контрольных группы (таблица 1). Лабораторным животным из экспериментальных групп препарат вводили однократно внутрибрюшинно. Мышам из 2 и 5 экспериментальных групп – в терапевтической дозе 20 мг/кг массы животного, мышам из 3 и 6 экспериментальных групп – в десятикратной терапевтической дозе 200 мг/кг массы животного. Животным из двух контрольных групп однократно внутрибрюшинно вводили воду для инъекций. Экспозиция препарата *in vivo* для животных из 1, 2 и 3 групп составила 4 часа, для животных из 4, 5 и 6 групп – 12 часов. Все животные содержались в одинаковых условиях, при свободном доступе к воде и корму. Все манипуляции проводили согласно Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, а также согласно Директиве совета европейского союза № 86/609/ЕЕС от 24 ноября 1986 года [20–22].

Для регистрации повреждений ДНК и оценки генотоксического действия препарата «Эмидонол 5%» на соматические клетки печени и почек использовали щелочной вариант метода ДНК-комет (другое название – гель-электрофорез изолированных клеток) [19,23]. В каждом микропрепарате рандомизированно анализировали не менее 100 ДНК-комет без наложений хвостов. В качестве показателя поврежденности ДНК использовали процентное содержание ДНК в «хвосте» кометы. Критерием положительного результата являлось статистически

достоверное увеличение показателя поврежденности ДНК клеток. Использовали химические реактивы фирмы «Panreac» (Испания), для окраски микропрепаратов использовали краситель SYBR Green I («Sigma-Aldrich», США). Микропрепараты анализировали на световом микроскопе Axioplan 2 Imaging с помощью камеры AxioCam HRm и программы для получения, обработки и анализа изображений AxioVision выпуск 4.6 («Carl Zeiss», Германия).

Таблица 1 – Алгоритм проведения эксперимента по изучению генотоксических свойств препарата

Группа	Доза препарата	Время экспозиции	Исследуемые органы-мишени
1	Контрольная группа	4 часа	печень, почки
2	20 мг/кг		печень, почки
3	200 мг/кг		печень, почки
4	Контрольная группа	12 часов	печень, почки
5	20 мг/кг		печень, почки
6	200 мг/кг		печень, почки

Анализ полученных данных проводили с помощью программы SPSS Statistics для Windows, версия 17.0. Статистическая оценка средних значений повреждения ДНК соматических клеток производилась методом Даннета и методом Геймса-Хоуэлла, оценку распределения данных проводили методом Колмогорова-Смирнова, оценку гомогенности дисперсии проводили по тесту Левена [24]. Различия между группами оценивали с использованием U-критерия Манна-Уитни. Статистическая значимость различий между уровнями признака в группах принималась при $p < 0,001$.

Для описания экспериментальных данных указывали количество проанализированных комет (N), медиану и интерквартильный размах содержания ДНК в «хвосте комет» (M (IQR), среднее значение и стандартное отклонение ($\mu \pm \sigma$), разность средних значений групп (между контрольной и экспериментальной группами) и стандартную ошибку ($S \pm SE$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве оценки генотоксичности для каждой группы были получены значения, показывающие процентное содержание ДНК в «хвосте комет». Тест Колмогорова-Смирнова показал, что полученные данные значительно отклоняются от нормального распределения ($p < 0,001$), тест Левена отклонил гипотезу о равенстве дисперсий ($p < 0,001$). Поэтому оценку полученных данных проводили с использованием непараметрического метода, не требующего равенства дисперсий - критерия Геймса-Хоуэлла, а также с использованием критерия Даннета, рекомендованного ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения России для сравнения среднegrupповых показателей поврежденности ДНК, полученных щелочным методом гель-электрофореза [19].

Для оценки генотоксического действия препарата были выбраны органы-мишени и время экспозиции *in vivo* на основе Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [19], и также исходя из токсикокинетических и токсикодинамических свойств препарата. Так, после парентерального введения препарат метаболизируется в печени, выводится из организма с мочой в глюкурон-конъюгированном виде и в незначительном количестве в неизменном виде на протяжении 10-12 часов. Наиболее интенсивный процесс экскреции наблюдается в первые 2 часа.

Препарат был исследован в терапевтической дозе 20 мг/кг, соответствующей 1/104 ЛД₅₀ и в десятикратной терапевтической дозе 200 мг/кг, соответствующей 1/10 ЛД₅₀.

В двух контрольных группах процентное содержание ДНК в «хвосте комет» клеток паренхиматозных органов варьирует от $5,40 \pm 8,58\%$ до $5,87 \pm 8,42\%$ ($\mu \pm \sigma$). После введения различных доз препарата при разной экспозиции обнаружены

статистически значимые различия в процентном содержании ДНК в «хвосте комет» во всех экспериментальных группах по сравнению с контрольными группами.

В клетках печени мышей после воздействия терапевтической дозы препарата при экспозициях 4 и 12 часов уровень ДНК в «хвосте комет» больше в сравнении с контрольными группами на $6,70 \pm 0,65\%$ и $7,13 \pm 0,69\%$ соответственно (таблица 2, рисунок 1). Однако разность среднего содержания ДНК в «хвосте комет» этих групп значимо не отличается и составляет $0,44 \pm 0,79\%$ (таблица 3).

При десятикратном увеличении дозы и экспозиции 4 часа уровень ДНК в «хвосте комет» клеток печени увеличивается на $15,95 \pm 0,75\%$ по сравнению с контрольной группой. После экспозиции 12 часов процент выхода ДНК также значимо больше, чем в контрольной группе на $13,28 \pm 0,80\%$, и незначительно ниже, чем при четырехчасовой экспозиции на $2,66 \pm 0,96\%$ ($p > 0,001$). Тенденция к уменьшению эффекта препарата при более длительной экспозиции может быть связана с происходящими процессами репарации ДНК [25].

Независимо от сроков экспозиции, содержание ДНК в «хвосте комет» клеток печени мышей, получивших препарат в терапевтической дозе (группы 2 и 5) значимо меньше, чем у мышей, получивших препарат в десятикратной дозе (группы 3 и 6). Так, при четырехчасовой экспозиции и введении десятикратной терапевтической дозы, выход ДНК больше на $9,25 \pm 0,84\%$, чем при введении терапевтической дозы. При двенадцатичасовой экспозиции это значение уменьшается, но значимо больше на $6,15 \pm 0,91\%$.

Таблица 2 – Результаты повреждающей активности препарата «Эмидонол 5%» на ДНК клеток печени *in vivo*

Экспозиция	4 часа			12 часов		
Группа, доза	1, ОК	2, 20 мг/кг	3, 200 мг/кг	4, ОК	5, 20 мг/кг	6, 200 мг/кг
Количество комет	304	499	507	498	495	500
M (IQR), %	3,99 (0,38 - 9,25)	9,67 (3,64 - 17,35)	22,01 (9,83 - 30,43)	2,49 (0,70 - 7,61)	9,33 (2,29 - 20,82)	15,49 (6,15 - 29,17)
$\mu \pm \sigma$, %	$5,85 \pm 6,50$	$12,55 \pm 11,86$	$21,80 \pm 14,67$	$5,87 \pm 8,42$	$13,00 \pm 12,87$	$19,15 \pm 15,79$
$S \pm SE \ddagger$, %		$6,70 \pm 0,89^*$	$15,95 \pm 0,89^*$		$7,13 \pm 0,78^*$	$13,28 \pm 0,78^*$
$S \pm SE \ddagger\ddagger$, %		$6,70 \pm 0,65^*$	$15,95 \pm 0,75^*$		$7,13 \pm 0,69^*$	$13,28 \pm 0,80^*$

Примечание: анализ полученных данных с использованием критерия Даннета $\ddagger$ и критерия Геймса-Хоуэлла $\ddagger\ddagger$; * статистически значимое отличие разности средних значений групп по критерию Даннета и критерию Геймса-Хоуэлла при $p < 0,001$.

Таблица 3 – Результаты разности средних значений групп по повреждающей активности препарата «Эмидонол 5%» на ДНК клеток печени *in vivo*

A \ B	1, ОК	2, 20 мг/кг	3, 200 мг/кг	5, 20 мг/кг	6, 200 мг/кг
2, 20 мг/кг	$6,70 \pm 0,65^*$	-	-	-	-
3, 200 мг/кг	$15,95 \pm 0,75^*$	$9,25 \pm 0,84^*$	-	-	-
5, 20 мг/кг	-	$0,44 \pm 0,79$	$-8,81 \pm 0,87^*$	-	-
6, 200 мг/кг	-	$6,59 \pm 0,88^*$	$-2,66 \pm 0,96$	$6,15 \pm 0,91^*$	-
4, ОК	-	-	-	$-7,13 \pm 0,69^*$	$-13,28 \pm 0,80^*$

Примечание: статистически значимое отличие разности между средними значениями групп (A-B) по критерию Геймса-Хоуэлла при * $p < 0,001$.

При исследовании ДНК-повреждающей активности терапевтической дозы препарата «Эмидонол 5%» на клетки почек выявлено, что процент выхода ДНК в «хвост комет» при экспозиции 4 и 12 часов больше, чем в контрольных группах на $3,30 \pm 0,65\%$ и $4,43 \pm 0,61\%$ соответственно (таблица 4, рисунок 1). Однако эти значения не значимо отличаются друг от друга на $0,70 \pm 0,70\%$ (таблица 5).

После воздействия препарата в десятикратной дозе и экспозиции 4 часа содержание ДНК в «хвосте комет» клеток почек увеличивается на $3,89 \pm 0,51\%$ по сравнению с контрольной группой. При увеличении экспозиции до 12 часов процент

выхода ДНК также значимо больше, чем в контрольной группе на $6,40 \pm 0,80\%$ и незначительно выше на $1,97 \pm 0,83\%$, чем при четырехчасовой экспозиции ($p > 0,001$).

Таблица 4 – Результат повреждающей активности препарата «Эмидонол 5%» на ДНК клеток почек *in vivo*

Экспозиция	4 часа			12 часов		
Группа, доза	1, ОК	2, 20 мг/кг	3, 200 мг/кг	4, ОК	5, 20 мг/кг	6, 200 мг/кг
Количество комет	504	500	567	463	473	418
M (IQR), %	2,56 (0,41 - 7,56)	3,98 (0,26 - 13,86)	8,01 (3,02 - 14,10)	3,00 (0,76 - 6,66)	7,64 (2,07 - 14,58)	7,04 (2,33 - 14,98)
$\mu \pm \sigma$, %	$5,83 \pm 8,62$	$9,13 \pm 11,80$	$9,72 \pm 8,00$	$5,40 \pm 8,58$	$9,83 \pm 10,08$	$11,80 \pm 14,10$
$S \pm SE$, %		$3,30 \pm 0,65^*$	$3,89 \pm 0,64^*$		$4,43 \pm 0,68^*$	$6,40 \pm 0,70^*$
$S \pm SE$, %		$3,30 \pm 0,65^*$	$3,89 \pm 0,51^*$		$4,43 \pm 0,61^*$	$6,40 \pm 0,80^*$

Примечание: анализ полученных данных с использованием критерия Даннета $\pm$ и критерия Геймса-Хоуэлла $\pm\pm$; * статистически значимое отличие разности средних значений групп по критерию Даннета и критерию Геймса-Хоуэлла при $p < 0,001$.

Таблица 5 – Результаты разности средних значений групп по повреждающей активности препарата «Эмидонол 5%» на ДНК клеток почек *in vivo*

А \ Б	1, ОК	2, 20 мг/кг	3, 200 мг/кг	5, 20 мг/кг	6, 200 мг/кг
2, 20 мг/кг	$3,30 \pm 0,65^*$	-	-	-	-
3, 200 мг/кг	$3,89 \pm 0,51^*$	$0,59 \pm 0,63$	-	-	-
5, 20 мг/кг	-	$0,70 \pm 0,70$	$0,11 \pm 0,57$	-	-
6, 200 мг/кг	-	$2,67 \pm 0,87$	$2,08 \pm 0,77$	$1,97 \pm 0,83$	-
4, ОК	-	-	-	$-4,43 \pm 0,61^*$	$-6,40 \pm 0,80^*$

Примечание: статистически значимое отличие разности между средними значениями групп (А-Б) по критерию Геймса-Хоуэлла при * $p < 0,001$.

Рисунок 1 – Диаграмма размаха процентного содержания ДНК в «хвосте комет» клеток печени и почек; каждый столбец соответствует данным, полученным от подопытных групп. Концы рисок обозначают 5 и 95% доверительные интервалы; максимальные и минимальные значения отмечены символом « $\gg$ »; среднее значение по выборке отмечено символом « $\bullet$ ». Статистически значимое отличие содержания ДНК в «хвосте комет» в экспериментальной группе по сравнению с контрольной группой по критерию Даннета и критерию Геймса-Хоуэлла указано * $p < 0,001$.

Независимо от сроков экспозиции, уровень ДНК в «хвосте комет» клеток почек мышей, получивших препарат в терапевтической дозе (группы 2 и 5) значительно не отличается от показателей мышей, получивших препарат в десятикратной дозе (группы 3 и 6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что в норме в организме происходит спонтанное повреждение ДНК. При применении препарата «Эмидонол 5%» установлено, что его генотоксическое действие зависит от дозы введения и сроков экспозиции *in vivo*. Так, при применении препарата в рекомендуемой терапевтической дозе 20 мг/кг при различных экспозициях не происходят значительные повреждения ДНК соматических клеток исследуемых органов, в сравнении с контрольными группами.

Однако при многократном повышении дозы до 200 мг/кг наблюдается увеличение повреждений ДНК клеток печени, что совпадает с периодом интенсивной экскреции препарата и местом биологической трансформации. Этот эффект при более длительной экспозиции имеет тенденцию к уменьшению, что может быть связано с клеточными механизмами компенсации и процессами репарации ДНК, происходящими в организме.

При исследовании ДНК клеток почек после введения десятикратной терапевтической дозы препарата не обнаружено значительных повреждений в сравнении с контрольной группой, как в период интенсивной экскреции, так и в период полного выведения.

На основе полученных данных можно заключить, что рекомендуемая терапевтическая доза препарата не обладает генотоксической активностью, а многократное повышение дозы ведет к увеличению показателя поврежденности ДНК.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Casares C., Ramirez-Camacho R. [et al.]. Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2012. Vol. 269, № 12. P. 2455–2459.
2. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*. 2002. Vol. 82, № 1. P. 47–95.
3. Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*. 2004. Vol. 303, № 5663. P. 1532–1535.
4. Birben E., Sahiner U. [et al.]. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*. 2012. Vol. 5, № 1. P. 9–19.
5. Poljsak B., Šuput D. [et al.]. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013. Vol. 2013. P. 1–11.
6. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*. 1997. Vol. 82, № 2. P. 291–295.
7. Stamler J., Singel D. [et al.]. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*. 1992. Vol. 258, № 5090. P. 1898–1902.
8. Negre-Salvayre A, Audebert N. [et al.]. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radical Research*. 2010. Vol. 44, № 10. P. 1125–1171.
9. Barron E.S.G., Levine S. Oxidation of alcohols by yeast alcohol dehydrogenase and by the living cell. The thiol groups of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1952. Vol. 41, № 1. P. 175–187.
10. Swallow A.J. The radiation chemistry of ethanol and diphosphopyridine nucleotide and its bearing on dehydrogenase action. *The Biochemical journal*. 1953. Vol. 54, № 2. P. 253–257.
11. Harman D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal of*

- Gerontology. 1956. Vol. 11, № 3. P. 298–300.
12. Nakabeppu Y., Sakumi K. [et al.]. Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. *Biological Chemistry*. 2006. Vol. 387, № 4. P. 373–379.
13. Sayre L., Smith M. [et al.]. Chemistry and Biochemistry of Oxidative Stress in Neurodegenerative Disease. *Current Medicinal Chemistry*. 2001. Vol. 8, № 7. P. 721–738.
14. Barbe F., Sacy A. [et al.]. Effect of antioxidant supplementation to the sows at peripartum on piglets survival at birth. 23rd International Pig Veterinary Society Congress IPVS. Cancun, Mexico, 2014. P. 200.
15. Pop V., Head E. [et al.]. Synergistic Effects of Long-Term Antioxidant Diet and Behavioral Enrichment on -Amyloid Load and Non-Amyloidogenic Processing in Aged Canines. *Journal of Neuroscience*. 2010. Vol. 30, № 29. P. 9831–9839.
16. Herbert V. Symposium□: Prooxidant Effects of Antioxidant Vitamins (Vitamin C-Driven Fre Radical Generation from Iron). *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1996. Vol. 1. P. 1213–1220.
17. Omenn G., Goodman G. [et al.]. Risk Factors for Lung Cancer and for Intervention Effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996. Vol. 88, № 21. P. 1550–1559.
18. Зиновьева В.Н., Островский О.В. Свободно-радикальное окисление ДНК и его биомаркер окисленный гуанозин (8-oxodG). *Вопросы медицинской химии*. 2002. Том 48, № 5. С. 419–431.
19. Миронов А.Н., Бунятян Н.Д. [и др.]. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Министерство Здравоохранения и Социального Развития Российской Федерации. 2012. 944 стр.
20. Приказ Минздрава СССР от 12.08.1977 № 755 “О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных.” СССР, 1977.
21. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. *European Treaty Series*. European Union, 1986.
22. Council Directive on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (86/609/EEC). 1986.
23. Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет in vitro: МР 4.2. 0014 - 10. Российская Федерация, 2010.
24. Lovell D.P., Omori T. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis*. 2008. Vol. 23, № 3. P. 171–182.
25. Watson J., Baker T. [et al.]. *Molecular Biology of the Gene*, 7th Edition. Pearson, 2014. 912 p.
26. Ленёв С.В. Антибиотикорезистентность музейных штаммов рода *Klebsiella* spp. *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. 2016 №5, стр. 38-45.