



## Разработка, валидация и применение методики оценки жизнеспособности *Escherichia coli* с помощью проточной цитометрии

А. С. Казакова<sup>1</sup>✉, А. Н. Афанасьева<sup>1</sup>, А. А. Еврейская<sup>1</sup>, А. Д. Акино<sup>1</sup>,  
А. К. Зенкова<sup>1</sup>, В. Б. Сапарова<sup>1</sup>, З. Р. Хасаншина<sup>1,2</sup>, М. Д. Бочкарева<sup>1</sup>, Р. В. Драй<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг». 198515, Россия, г. Санкт-Петербург, поселок Стрельна, ул. Связи, д. 34-А

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО» (Университет ИТМО). 197101, Россия, г. Санкт-Петербург, Кронверкский проспект, д. 49, литер А

✉ Контактное лицо: Казакова Анна Сергеевна. E-mail: [anna.kazakova@geropharm.com](mailto:anna.kazakova@geropharm.com)

ORCID: А.С. Казакова – <https://orcid.org/0000-0002-5983-4080>;  
А. Н. Афанасьева – <https://orcid.org/0000-0002-1443-4294>;  
А. А. Еврейская – <https://orcid.org/0009-0004-0137-8467>;  
А. Д. Акино – <https://orcid.org/0000-0001-6516-7184>;  
А. К. Зенкова – <https://orcid.org/0009-0001-5183-6874>;  
В. Б. Сапарова – <https://orcid.org/0000-0002-8445-1129>;  
З. Р. Хасаншина – <https://orcid.org/0000-0002-0065-1853>;  
М. Д. Бочкарева – <https://orcid.org/0009-0001-1489-2957>;  
Р. В. Драй – <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>.

Статья поступила: 22.07.2025

Статья принята в печать: 30.01.2026

Статья опубликована: 30.01.2026

### Резюме

**Введение.** Около 30 % генно-инженерных терапевтических белков производится в *Escherichia coli*. При наработке рекомбинантных белков одним из факторов, определяющих эффективность процесса и качество продукта, является показатель жизнеспособности клеток. Важно контролировать жизнеспособность при формировании банков клеток и оценке их стабильности в процессе хранения, а также при разработке условий культивирования штаммов. Изменение условий хранения или культивирования может приводить к изменению структуры клеточной популяции с изменением соотношения жизнеспособных, мертвых и находящихся в апоптозоподобной гибели (ALD, apoptosis-like death) клеток. Одним из способов оценки популяций клеток может являться метод проточной цитометрии с окрашиванием.

**Цель.** Разработать, валидировать и апробировать методику оценки жизнеспособности *E. coli* с использованием проточной цитометрии.

**Материалы и методы.** Для оценки жизнеспособности клеток проводили окрашивание *E. coli* пропидия йодидом (PI) и аннексином V-FITC (An-V-FITC). При помощи двойного окрашивания определяли популяции клеток живых, мертвых и в ALD. Валидацию методики проводили согласно Государственной фармакопее, решению Совета ЕЭК № 85 от 03.11.2016 и рекомендациям ICH. Анализировали применимость методики при разработке условий создания банков клеток и их культивировании.

**Результаты и обсуждение.** Разработана методика оценки жизнеспособности *E. coli* с использованием проточной цитометрии и окрашивания PI с An-V-FITC, позволяющая оценить популяции клеток живых, мертвых и в ALD. По итогам валидации методики установлено ее соответствие критериям: специфичности (6 %), линейности ( $R^2 > 0,9$ ), правильности (97–102 %), пределу количественного определения (подтвержден, 117 %), сходимости (1–10 %), внутрिलाбораторной прецизионности (2–17 %), аналитической области (6,4–100 %). При оптимизации условий создания банков клеток оценка жизнеспособности позволила определить, что для получения более 97 % жизнеспособных клеток после выхода из криоконсервации необходимо использовать соотношение объемов культуральной жидкости и криопротектора 3 к 1 при оптической плотности суспензии  $OD_{600} = 15$ . При разработке процесса культивирования штамма методика позволила определить оптимальные условия, в результате в биореакторе за 8 часов индукции процент мертвых клеток увеличился всего на 2,5 %, а клеток в состоянии ALD – на 7 %.

© Казакова А. С., Афанасьева А. Н., Еврейская А. А., Акино А. Д., Зенкова А. К., Сапарова В. Б., Хасаншина З. Р., Бочкарева М. Д., Драй Р. В., 2026

© Kazakova A. S., Afanaseva A. N., Evreiskaya A. A., Akino A. D., Zenkova A. K., Saparova V. B., Khasanshina Z. R., Bochkareva M. D., Drai R. V., 2026

**Заключение.** Разработана и валидирована методика для оценки жизнеспособности *E. coli*, она может использоваться на этапе разработки и производства терапевтических продуктов.

**Ключевые слова:** фармацевтическая разработка, проточная цитометрия, жизнеспособность прокариотических клеток, *E. coli*, валидация методики

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Вклад авторов.** А. С. Казакова, А. Д. Акино, М. Д. Бочкарева и З. Р. Хасаншина разрабатывали методологию и планы экспериментов. А. С. Казакова, А. А. Еврейская, А. К. Зенкова проводили эксперименты. А. Н. Афанасьева и В. Б. Сапарова участвовали в подборе валидационных параметров и обработке данных по валидации. А. С. Казакова, З. Р. Хасаншина, М. Д. Бочкарева участвовали в написании текста статьи. Р. В. Драй руководил работой. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «ГЕРОФАРМ». Спонсор не оказывал влияния на ход исследования и интерпретацию результатов.

**Для цитирования:** Казакова А. С., Афанасьева А. Н., Еврейская А. А., Акино А. Д., Зенкова А. К., Сапарова В. Б., Хасаншина З. Р., Бочкарева М. Д., Драй Р. В. Разработка, валидация и применение методики оценки жизнеспособности *Escherichia coli* с помощью проточной цитометрии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(1). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2150>

## Development, validation, and application of a method for assessing the viability of *Escherichia coli* for flow cytometry

Anna S. Kazakova<sup>1</sup>✉, Alina N. Afanaseva<sup>1</sup>, Anastasia A. Evreiskaya<sup>1</sup>, Artur D. Akino<sup>1</sup>,  
Arina K. Zenkova<sup>1</sup>, Valeria B. Saparova<sup>1</sup>, Zukhra R. Khasanshina<sup>1, 2</sup>,  
Maria D. Bochkareva<sup>1</sup>, Roman V. Drai<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Closed Joint-Stock Company "Pharm-Holding". 34-A, Svyazi str., Strelna settlement, Saint-Petersburg, 198515, Russia

<sup>2</sup> ITMO University. 49A, Kronverksky prospekt, Saint-Petersburg, 197101, Russia

✉ **Corresponding author:** Anna S. Kazakova. **E-mail:** [anna.kazakova@geropharm.com](mailto:anna.kazakova@geropharm.com)

**ORCID:** Anna S. Kazakova – <https://orcid.org/0000-0002-5983-4080>;  
Alina N. Afanaseva – <https://orcid.org/0000-0002-1443-4294>;  
Anastasia A. Evreiskaya – <https://orcid.org/0009-0004-0137-8467>;  
Artur D. Akino – <https://orcid.org/0000-0001-6516-7184>;  
Arina K. Zenkova – <https://orcid.org/0009-0001-5183-6874>;  
Valeria B. Saparova – <https://orcid.org/0000-0002-8445-1129>;  
Zukhra R. Khasanshina – <https://orcid.org/0000-0002-0065-1853>;  
Maria D. Bochkareva – <https://orcid.org/0009-0001-1489-2957>;  
Roman V. Drai – <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>.

**Received:** 22.07.2025

**Accepted:** 30.01.2026

**Published:** 30.01.2026

### Abstract

**Introduction.** About 30 % of genetically engineered therapeutic proteins are produced in *Escherichia coli*. In the production of these proteins, cell viability is one of the key factors determining process efficiency and product quality. Controlling viability is essential when creating cell banks and optimizing *E. coli* cultivation conditions. Changes in cultivation parameters can affect viability and lead to shifts in the proportions of viable cells, dead cells, and cells undergoing apoptosis-like death (ALD). Flow cytometry is one method used to assess viability and distinguish between different cell populations.

**Aim.** To develop, validate and test a methodology for assessing the viability of *E. coli* using flow cytometry.

**Materials and methods.** To assess cell viability, we stained *E. coli* with propidium iodide (PI) and annexin V-FITC (An-V-FITC). We identified populations of live, dead, and ALD cells using dual staining with PI and An-V-FITC. The method was validated in accordance with the State Pharmacopoeia, the Decision of the EEC Council No. 85 dated 03.11.2016, and ICH guidelines. We evaluated the method's applicability in developing conditions for cell bank creation and cultivation.

**Results and discussion.** We developed a method for assessing the viability of *E. coli* cells using flow cytometry and dual staining with PI and An-V-FITC, which enables the identification of live, dead, and ALD cell populations. Validation results demonstrated that the method meets the criteria: specificity (6 %), linearity ( $R^2 > 0.9$ ), accuracy (97–102 %), the limit of quantification (confirmed, 117 %), repeatability (1–10 %), intra-laboratory precision (2–17 %), analytical range (6.4–100 %). In selecting optimal conditions for cell bank creation, viability assessment enabled us to determine the optimal ratio of culture fluid to cryoprotectant (3:1) at an optical density of  $OD_{600} = 15$ , resulting in over 97 % viable cells after cryopreservation. During strain cultivation process development, the method facilitated the selection of optimal conditions. In the bioreactor, the proportion of dead cells increased by only 2.5 %, and the proportion of ALD cells increased by 7 % after 8 hours of induction.

**Conclusion.** We developed and validated a methodology for assessing *E. coli* viability that can be used during the development and production of therapeutic products.

**Keywords:** pharmaceutical development, flow cytometry, viability of prokaryotic cells, *E. coli*, validation of a method

**Conflict of interest.** The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Contribution of the authors.** Anna S. Kazakova, Artur D. Akino, Maria D. Bochkareva, and Zukhra R. Khasanshina developed the methodology and experimental plans. Anna S. Kazakova, Anastasia A. Evreiskaya, and Arina K. Zenkova conducted the experiments. Alina N. Afanasyeva and Valeria B. Saparova participated in selecting validation parameters and processing validation data. Anna S. Kazakova, Zukhra R. Khasanshina, and Maria D. Bochkareva contributed to writing the manuscript. Roman V. Drai supervised the work. All authors participated in the discussion of the results.

**Funding.** This study was supported by LLC "GEROPHARM". The sponsor had no influence on the study's conduct or interpretation of the results.

**For citation:** Kazakova A. S., Afanaseva A. N., Evreiskaya A. A., Akino A. D., Zenkova A. K., Saparova V. B., Khasanshina Z. R., Bochkareva M. D., Drai R. V. Development, validation, and application of a method for assessing the viability of *Escherichia coli* for flow cytometry. *Drug development & registration*. 2026;15(1). (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-1-2150>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ALD (apoptosis-like death) – апоптозоподобная гибель;  
An-V (annexin V) – аннексин V;  
CV (variation coefficient) – коэффициент вариации;  
FITC (Fluorescein Isothiocyanate) – флуоресцеинизотиоцианат;  
ICH (International Council on Harmonisation) – Международный совет по гармонизации;  
SD (Standard Deviation) – стандартное отклонение;  
PI – пропидия йодид;  
PE (Phycoerythrin) – фикоэритрин;  
ЕЭК – Евразийская экономическая комиссия;  
КОЕ – колониеобразующая единица;  
НПКО – нижний предел количественного определения;  
ПКО – предел количественного определения.

## ВВЕДЕНИЕ

Жизнеспособность – один из ключевых параметров при работе со штаммами – продуцентами рекомбинантных белков. Она особенно важна при создании банков клеток *Escherichia coli*, а также при разработке и масштабировании условий их культивирования. Снижение жизнеспособности штамма-продуцента напрямую влияет на качество продукта и стабильность процесса. Согласно решению Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 77<sup>1</sup> и рекомендациям

ICH Q5<sup>2</sup>, необходим регулярный мониторинг жизнеспособности клеток в банках для обеспечения их качества и стабильности.

При разработке условий культивирования важно оперативно выявлять изменения в состоянии клеток. При снижении жизнеспособности клеток, вызванной такими факторами, как недостаточная аэрация в биореакторе, накопление токсичных метаболитов, возможно проводить корректирующие действия в реальном времени и тем самым улучшать выход целевого продукта, стабильность и воспроизводимость процесса [1].

Решение данных задач требует надежной, воспроизводимой и технологически применимой методики оценки жизнеспособности клеток *E. coli*. Одним из используемых стандартных методов является подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ)<sup>3,4</sup>. Несмотря на свою простоту, он имеет ряд недостатков: невозможность быстро оценить жизнеспособность, так как требуется время для роста колоний [2], а также недостаточную точность подсчетов [3]. В качестве альтернативного метода, позволяющего быстро и надежно проанализировать жизнеспособность каж-

<sup>2</sup> European Medicines Agency. ICH Guidelines. Available at: <https://www.ich.org/page/ich-guidelines>. Accessed: 29.05.2025.

<sup>3</sup> International Organization for Standardization. ISO 4833-1:2013. Available at: <https://www.iso.org/standard/53728.html>. Accessed: 29.05.2025.

<sup>4</sup> ASTM F2944-20. Standard Practice for Automated Colony Forming Unit (CFU) Assays – Image Acquisition and Analysis Method for Enumerating and Characterizing Cells and Colonies in Culture. Available at: <https://store.astm.org/f2944-20.html>. Accessed: 29.05.2025.

<sup>1</sup> Согласно решению Совета ЕЭК от 03.11.2016 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза». Доступно по: <https://docs.eaeunion.org/documents/306/2586/> Ссылка активна на 29.05.2025.

дой клетки, возможно использовать проточную цитометрию [4].

В ряде научных статей описывали оценку жизнеспособности микроорганизмов с использованием проточной цитометрии с флуоресцентными красителями для разных задач: проверки антимикробной активности [5], определения эффективности стерилизации в медицине [6], дезинфекции в пищевой промышленности [7], обнаружения антибактериального потенциала жидкостей в металлообработке [8]. Однако в настоящее время не описана валидированная методика оценки жизнеспособности клеток *E. coli* методом проточной цитометрии для применения в фармацевтической разработке.

Для оценки жизнеспособности клеток с помощью проточной цитометрии чаще всего используют двойную окраску флуоресцирующими агентами [9, 10, 11]. Пропидия йодид (PI) является одним из наиболее используемых интеркалирующих флуоресцентных красителей для детектирования мертвых клеток, который селективно связывается с двухцепочечными нуклеиновыми кислотами при нарушении целостности клеточной мембраны и не проникает через интактные мембраны жизнеспособных клеток [10, 11]. В сочетании с PI для выявления промежуточного состояния жизнеспособности клеток описано использование аннексина V-FITC (An-V-FITC), который связывается с фосфатидилсерином, перемещающимся из внутреннего во внешний слой клеточной мембраны при запуске апоптозоподобной гибели [12, 13].

Анализ жизнеспособности с помощью PI и An-V-FITC обычно проводится на эукариотических клетках [12], но эта комбинация может быть использована и для оценки жизнеспособности *E. coli*, что было продемонстрировано несколькими авторами [14, 15]. Несмотря на то, что классический механизм апоптоза характерен для эукариот, у прокариотических клеток, включая *E. coli*, описана апоптозоподобная гибель (ALD), сопровождающаяся экспозицией фосфатидилсерины и другими маркерами контролируемой клеточной гибели [16–21]. В ряде исследований показано, что использование двойной окраски PI и An-V-FITC позволяет достоверно дифференцировать бактериальные популяции с нарушением мембранной асимметрии и целостности оболочки, что коррелирует с функциональной потерей жизнеспособности [15, 19, 22]. Таким образом, этот метод позволяет различать субпопуляции прокариотических клеток – живые, в процессе ALD и мертвые, что делает его инструментом для оценки жизнеспособности, а не специфическим тестом на апоптоз.

Согласно требованиям регуляторных органов и международным рекомендациям, для использования методики на этапе разработки терапевтических препаратов и получения достоверных, надежных и вос-

производимых результатов необходимо валидировать методику<sup>1,2,3</sup>.

Таким образом, **цель работы** заключалась в разработке и валидации методики оценки жизнеспособности *E. coli* с использованием метода проточной цитометрии, а также ее апробации в рамках фармацевтической разработки.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Штамм и условия культивирования.** Для оценки жизнеспособности использовали *E. coli*, штамм BL21 (кат. № C2530H, New England Biolabs, США), который засеивали в 50 мл среды Luria-Bertani [23], растили в шейкере-инкубаторе Ecotron (INFORS HT, Швейцария) при 37 °C около 18 ч при перемешивании со скоростью 180 об/мин. При OD<sub>600</sub> = 2 ± 0,2 отбирали 2 мл пробы суспензии клеток, центрифугировали 10 мин при 4200 g, супернатант сливали, клетки ресуспендировали в 100 мкл воды очищенной стерильной.

**Окрашивание клеток.** Окраска для оценки жизнеспособности проводилась согласно рекомендациям производителя. Для окраски An-V-FITC (кат. № 640945, BioLegend, США) и PI (кат. № P4170, Sigma-Aldrich, США) к 100 мкл суспензии клеток в воде добавляли 100 мкл аннексинсвязывающего буфера (кат. № 422201, BioLegend, США), 2 мкл An-V-FITC и 8 мкл PI (1 мг/мл), инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 15 мин. После инкубирования пробу центрифугировали 10 мин при 4200 g, супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 2 мл воды очищенной стерильной.

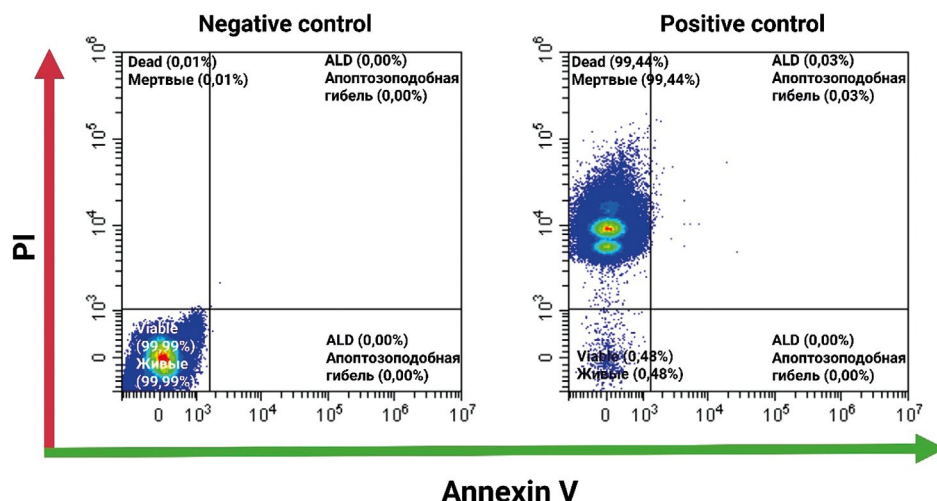
**Подготовка контролей для проточной цитометрии.** В качестве положительного контроля (~100 % живые клетки) использовали необработанную суспензию клеток, отбираемую на стадии логарифмического роста в оптимальных условиях культивирования. Для получения отрицательного контроля (~100 % мертвые клетки) к 100 мкл суспензии клеток добавляли 900 мкл 99%-го изопропилового спирта, инкубировали 60 мин при комнатной температуре при перемешивании. Для валидации методики пробы отрицательного и положительного контролей смешивали для получения значений жизнеспособности: 1,024; 2,56; 6,4; 10; 16; 40; 70; 100 %.

<sup>1</sup> Guidance document. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. 2015. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/analytical-procedures-and-methods-validation-drugs-and-biologics>. Accessed: 29.05.2025.

<sup>2</sup> Bioanalytical method validation – Scientific guideline. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>. Accessed: 29.05.2025.

<sup>3</sup> Russia State Pharmacopoeia. Available at: <https://pharmacopoeia.ru/en/russian-pharmacopoeia/> Accessed: 29.05.2025.





**Рисунок 1. Двухпараметровый точечный график PI-PE против An-V-FITC: отрицательный и положительный контроли**

**Figure 1. Two-parameter PI-PE vs. An-V-FITC dot plot: positive and negative controls**

#### Анализ образцов на проточном цитометре.

Образцы анализировали с использованием проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США), оборудованном тремя диодными лазерами с длинами волн 405, 488 и 638 нм. Детекция флуоресцентного сигнала происходила с использованием стандартной конфигурации прибора (светофильтр 585/42 нм для канала PE и светофильтр 525/40 нм для канала FITC). Коэффициенты усиления фотоумножителя были установлены в логарифмическом режиме для сбора данных о флуоресценции. Настройки напряжения лазеров были выставлены автоматически по результатам калибровки с использованием Daily QC. В каждом анализируемом образце было собрано не менее 100 000 клеток.

Данные проточной цитометрии анализировали с помощью программного обеспечения CytExpert (ver. 2.4.0.28, Beckman Coulter, США). На первом этапе анализа с помощью линейных значений интегральных параметров прямого (SSC) и бокового светорассеяния (FSC) была идентифицирована популяция клеток. В пределах общего пула клеток с помощью двухпараметрового графика PI-PE против An-V-FITC были определены PI-положительные, An-V-FITC-положительные, а также дубль-негативные и дубль-положительные клетки (рисунок 1). Данная стратегия гейтирования позволила определить четыре популяции клеток:

1. Живые (левый нижний квадрант, отрицательный по обоим маркерам).
2. Мертвые (левый верхний квадрант, отрицательный по An-V-FITC и положительный по PI-PE).
3. ранняя ALD/апоптозоподобная гибель (правый нижний квадрант, положительный по An-V-FITC, отрицательный по PI-PE).

4. Поздняя ALD/апоптозоподобная гибель (правый верхний квадрант, положительный по An-V-FITC и PI-PE).

Для подсчета клеток, находящихся в состоянии апоптозоподобной гибели, события из популяций «ранняя ALD» и «поздняя ALD» суммировались. Такое объединение позволяет оценить последовательно развивающиеся стадии апоптозоподобной гибели, характеризующейся экспозицией фосфатидилсерина на поверхности клеточной мембраны [15, 18].

**Валидация методики и критерии приемлемости.** Параметры валидации выбраны и рассчитаны в соответствии с Государственной фармакопеей<sup>1</sup>, решением Совета ЕЭК № 85 от 03.11.2016<sup>2</sup> и рекомендациями ICH<sup>3</sup>. Оценивали следующие параметры: специфичность, нижний предел количественного определения (НПКО), аналитическую область, линейность, правильность, сходимость, внутрилабораторную прецизионность.

**Предел количественного определения, линейность и аналитическая область.** По результатам первого эксперимента по валидации установлено, что для параметра «правильность» показатель открываемости находится в требуемом диапазоне (100 ± 15 %) при значениях жизнеспособности выше

<sup>1</sup> Russia State Pharmacopoeia. Available at: <https://pharmacopoeia.ru/en/russian-pharmacopoeia/> Accessed: 29.05.2025.

<sup>2</sup> Решение Совета ЕЭК № 85 от 03.11.2016 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: <https://docs.eaeunion.org/documents/306/2592/> Ссылка активна на 29.05.2025.

<sup>3</sup> European Medicines Agency. ICH Guidelines. Available at: <https://www.ich.org/page/ich-guidelines>. Accessed: 29.05.2025.

6,4 %, поэтому НПКО методики установлен как 6,4 %. Предел количественного определения (ПКО) оценивался для точек: верхней (100 %), средней (40 %), нижней (16 %) и НПКО (6,4 %). НПКО должен не менее чем на 20 % превосходить значение образца с жизнеспособностью 0 %, соответствие этому рассчитывалось как отношение среднего значения флуоресценции при жизнеспособности 0 % к среднему значению флуоресценции НПКО. Линейная зависимость для концентраций с коэффициентом детерминации R2 должна быть не ниже 0,9.

**Специфичность** рассчитывалась как отношение среднего значения флуоресценции неокрашенного образца к среднему значению флуоресценции образца НПКО. Критерием приемлемости является отсутствие искажающего влияния компонентов холостого образца, сигнал не должен превышать 20 % для анализируемого образца.

**Правильность** методики характеризуется показателем открываемости, которая рассчитывалась как отклонение среднего результата определений от значения, принимаемого за истинное (номинальное), и выражается в процентах. Для не менее чем 5 повторов одной величины жизнеспособности и не менее чем 4 различных уровней жизнеспособности должен сохраняться разброс от номинальных значений  $100 \pm 20$  %.

**Сходимость** (повторяемость) методики оценивали по результатам, полученным в одинаковых условиях в одной лаборатории (один и тот же исполнитель, одно и то же оборудование, один и тот же набор реактивов) в один день. При оценке рассматривали пять повторов на пяти уровнях жизнеспособности: НПКО (6,4 %), низком (10 %), ниже среднего (16 %), среднем (40 %) и высоком уровне (70 %). Для не менее чем 5 повторов на менее 4 различных уровнях жизнеспособности должен сохраняться коэффициент вариации (CV)  $\leq 15$  % и для НПКО – CV  $\leq 20$  %.

**Внутрилабораторная прецизионность** характеризуется величиной коэффициента вариации CV, выражаемой в процентах. Ее оценивали в условиях работы одной лаборатории в разные дни. Для образцов не менее чем из 3 проанализированных циклов, проведенных в течение не менее чем 2 различных дней, должен сохраняться CV  $\leq 20$  %.

**Оценка жизнеспособности при создании банков клеток.** При подборе условий создания банков клеток оценивали жизнеспособность для соотношений суспензии клеток и криопротектора 1:1, 2:1, 3:1 при оптической плотности суспензии  $OD_{600} = 10$  и  $OD_{600} = 15$ .

**Оценка жизнеспособности при разработке условий культивирования.** Для проверки применимости методики на этапе разработки условий культивирования анализировали жизнеспособность клеток из биореактора на 0, 2, 4 и 8-й час индукции экспрессии белка.

Таблица 1. Оценка жизнеспособности клеток с помощью проточной цитометрии в экспериментах по валидации  
Table 1. Assessment of cell viability by flow cytometry in validation experiments

№ пробы Sample number	Живые клетки (не окрашиваются) Living cells (not stained), %			Мертвые клетки (окрашиваются PI), % Dead cells (stained with PI), %			№ эксперимента Experiment number			Значение флуоресценции (PI, PE-A) Fluorescence value (PI, PE-A)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1. Ожидаемо 6,4 % живые 1. Expected 6.4 % viable	15,42 ± 0,74	13,96 ± 1,84	19,57 ± 0,88	84,52 ± 0,73	85,93 ± 1,85	80,144 ± 0,80	8803,99 ± 288,78	15778,28 ± 200,05	9202 ± 324,74			
2. Ожидаемо 10 % живые 2. Expected 10 % viable	–	19,22 ± 1,43	27,40 ± 1,14	–	80,58 ± 1,44	72,152 ± 1,27	–	14316,44 ± 341,37	8313,44 ± 195,61			
3. Ожидаемо 16 % живые 3. Expected 16 % viable	31,54 ± 2,67	28,58 ± 0,35	37,25 ± 4,51	68,39 ± 2,66	71,21 ± 0,36	62,24 ± 4,35	6939,85 ± 494,05	12626,44 ± 185,45	7153,38 ± 617,02			
4. Ожидаемо 40 % живые 4. Expected 40 % viable	59,77 ± 3,71	56,95 ± 0,77	63,53 ± 1,81	40,12 ± 3,69	42,77 ± 0,74	36,05 ± 1,78	4018,64 ± 447,73	7516,80 ± 247,81	4113,8 ± 180,44			
5. Ожидаемо 70 % живые 5. Expected 70 % viable	–	80,35 ± 1,47	88,29 ± 1,06	–	18,77 ± 1,08	11,52 ± 1,00	–	3231,08 ± 320,76	1210,8 ± 103,81			
6. Ожидаемо 100 % живые 6. Expected 100 % viable	91,96 ± 0,10	96,27 ± 0,26	96,12 ± 1,17	7,84 ± 0,10	3,07 ± 0,17	3,63 ± 1,24	675,96 ± 36,45	482,28 ± 33,88	437,48 ± 44,31			

**Статистическая обработка данных** проводилась в GraphPad Prism (ver. 9.5.1, GraphPad Software, США). В GraphPad Prism были построены графики линейности, на основании которых определялся коэффициент детерминации  $R^2$ . Рассчитывалось стандартное отклонение (SD), коэффициент вариации (CV).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Двухпараметровая флуоресцентная окраска An-V-FITC и PI позволила достоверно разделять популяции живых, апоптозоподобных и мертвых клеток *E. coli*. Пример показан на рисунке 1. При анализе *E. coli* были выявлены клетки, которые реагировали на повреждения по механизму запрограммированной клеточной гибели, имеющей черты эукариотического апоптоза, поэтому они относятся к группе клеток с апоптозоподобной гибелью [18, 22, 24].

По итогам разработки методики была проведена ее валидация, данные из экспериментов по среднему значению с указанием стандартного отклонения показаны в таблице 1.

**Специфичность.** Расчет специфичности представлен в таблице 2. Ответ соответствовал 6 % сигнала для исследуемого образца, что согласуется с критериями приемлемости менее 20 %.

**Предел количественного определения, линейность и аналитическая область.** Сигнал анализируемого вещества из образца с НПКО превосходит величину сигнала образца с 0 % жизнеспособностью на 117 %, что удовлетворяет критерию приемлемости (>20 %) (таблица 3).

Аналитическая область определяется в линейном диапазоне 6,4–100 % живых клеток (таблица 4).

**Таблица 2. Специфичность**

**Table 2. Specificity**

100 % жизнеспособные клетки 100 % viable cells	Флуоресценция Fluorescence					Неокрашенные / окрашенные · 100 % Unstained / Stained · 100 %
Окрашенные Stained	522,1	445,7	514,5	465,1	464,0	6 %
Неокрашенные Unstained	32,5	23,2	24,8	–	–	

Коэффициент детерминации  $R^2$  выше 0,9, что соответствует критериям приемлемости для линейности (таблица 5, рисунок 2).

**Таблица 5. Линейность**

**Table 5. Linearity**

№ эксперимента Experiment number	$R^2$
1	0,9633
2	0,9905
3	0,9906

**Правильность** методики находится в диапазоне от 97 до 102 %, что удовлетворяет критериям приемлемости  $100 \pm 20$  % (таблица 6).

Результаты по параметру **сходимость** находятся в диапазоне от 1 до 10 %, что удовлетворяет критерию приемлемости  $CV \leq 15$  % (таблица 7).

**Таблица 3. Предел количественного определения**

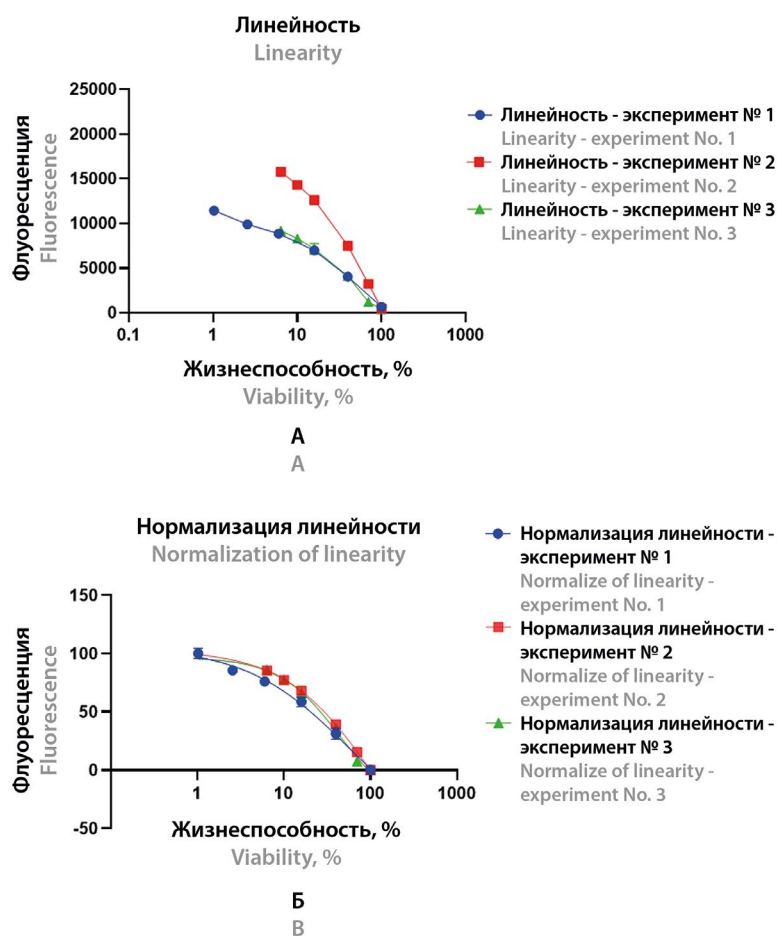
**Table 3. The limit of quantification**

Жизнеспособность, % Viability, %	Флуоресценция Fluorescence					(НПКО/ХП) · 100 % (LLQD/BS) · 100 %
6,40 (НПКО) 6,40 (LLQD) lower limit of quantitative determination	15600,8	15676,9	15741	16119,3	15753,4	117 %
0 (холостая проба) 0 (BS) Blank sample	18823,4	15651,2	19449	19189,7	18810,6	

**Таблица 4. Аналитическая область**

**Table 4. Analytical area**

Жизнеспособность, % Viability, %	Найденные значения жизнеспособности по флуоресценции Calculated fluorescence viability values					Открываемость, % Recoverability, %
100	95,6	95,4	94,9	93,5	97,0	105
40	39,9	36,7	35,5	37,9	38,0	106
16,0	14,3	22,1	14,1	14,3	17,9	97
6,4	7,6	7,3	6,0	5,5	3,6	107



**Рисунок 2.** Графики линейности (А) и нормализованной линейности (Б), показывающие зависимость флуоресценции от жизнеспособности

**Figure 2.** Graphs of linearity (A) and normalize of linearity (B) showing the dependence of fluorescence on viability

**Таблица 6.** Правильность

**Table 6.** Accuracy

Жизнеспособность, % Viability, %	Найденные значения жизнеспособности по флуоресценции Calculated fluorescence viability values					Открываемость, % Recoverability, %
100	99,06	99,98	99,15	99,75	99,77	100
70	72,80	72,51	65,99	72,18	70,68	99
40	40,09	40,06	37,45	39,06	43,06	100
16,0	17,04	15,25	15,68	15,83	15,74	101
10,00	9,80	11,84	9,04	10,48	10,52	97
6,400	6,70	6,50	6,34	5,39	6,31	102

**Таблица 7.** Сходимость

**Table 7.** Repeatability

Жизнеспособность, % Viability, %	Флуоресценция Fluorescence					CV, %
70	3010,7	3041,4	3781,8	3077,6	3243,9	10
40	7223,2	7430,8	7436	7887,6	7606,4	3
16	12313,6	12808,4	12690,1	12648,2	12671,9	1
10	14489,2	13826,6	14751,5	14264,5	14250,4	2
6,4	15600,8	15676,9	15741	16119,3	15753,4	1



Таблица 8. Внутрिलाбораторная прецизионность  
Table 8. Intra-laboratory precision

Дата Date	07.03.2024	28.03.2024	26.04.2024	CV, %
Исполнитель Analyst	№ 1	№ 1	№ 2	
Жизнеспособность, % Viability, %	Эксперимент № 1 Experiment No. 1	Эксперимент № 2 Experiment No. 2	Эксперимент № 3 Experiment No. 3	
100	91,76 92,00 91,92 91,86 91,92	96,46 95,91 96,08 96,43 96,47	96,60 96,60 94,10 96,60 97,10	2
40	61,16 56,42 59,03 56,75 59,03	57,58 57,51 57,06 55,66 56,92	62,80 65,41 60,74 62,80 64,28	6
16	28,33 31,37 35,67 30,76 32,26	28,65 29,15 28,48 28,42 28,22	42,82 32,16 37,33 42,82 40,46	14
6,4	16,5 15,48 15,93 14,88 14,49	13,11 17,13 12,9 13,99 12,66	20,67 20,18 18,43 19,40 19,15	17

Результаты по параметру **внутрिलाбораторная прецизионность** находятся в диапазоне от 2 до 17 %, что удовлетворяет критериям приемлемости  $CV \leq 20 \%$  (таблица 8).

**Оценка жизнеспособности при создании банков клеток.** Разработанная методика была использована в процессе оптимизации криоконсервации банков клеток штаммов-продуцентов *E. coli*. Проводилась оценка влияния оптической плотности и соотношения объемов клеточной суспензии и криопротектора при закладке банков в среде с химически определенным составом среды при дефиците питательных веществ. В качестве целевого показателя жизнеспособности при разморозке принимали значение 95 % жизнеспособных клеток.

По итогам оптимизации выбраны условия, обеспечивающие более 97 % жизнеспособных клеток после выхода из криоконсервации, а также определены границы нормы показателя в спецификациях для оценки банков клеток в процессе закладки и контроля стабильности во время их хранения. Оптимальные условия достигнуты при оптической плотности суспензии перед замораживанием  $OD_{600} = 15$ , соотношении объемов культуральной жидкости и криопротектора 3 к 1 (таблица 9).

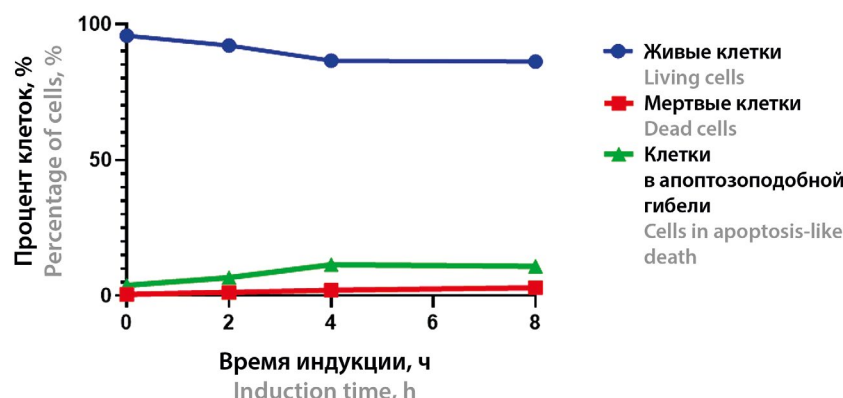
Таблица 9. Процент живых и мертвых клеток после криоконсервации

Table 9. Percentage of living and dead cells after cryopreservation

Значения о.е. суспензии при $OD_{600}$ Values of o.u. suspensions at $OD_{600}$	Соотношение суспензии клеток и криопротектора The ratio of cell suspension and cryoprotectant	Живые, % Viable, %	Мертвые, % Dead, %
10	1:1	$94,94 \pm 0,22$	$4,83 \pm 0,24$
	2:1	$92,41 \pm 0,31$	$7,45 \pm 0,30$
	3:1	$95,07 \pm 0,15$	$4,81 \pm 0,14$
15	1:1	$93,79 \pm 0,15$	$6,17 \pm 0,14$
	2:1	$97,24 \pm 0,05$	$2,70 \pm 0,04$
	3:1	$96,57 \pm 0,07$	$3,41 \pm 0,06$

Оценка жизнеспособности при разработке условий культивирования. Методика была использована в процессе разработки условий культивирования штаммов-продуцентов *E. coli* в скрининговых биореакторах Multifors 2 (INFORS HT, Швейцария). Жизнеспособность клеток в итоговом процессе культивирования представлена на рисунке 3.

Оценка жизнеспособности показана с момента индукции экспрессии белка в связи с тем, что именно в этот период возможно наиболее критичное снижение жизнеспособности клеток. По графику видно, что за 8 ч индукции процент жизнеспособных клеток сни-



**Рисунок 3.** Диаграммы жизнеспособности клеток в зависимости от времени индукции при культивировании в биореакторе

**Figure 3.** Graphs showing the dependence of cell viability on induction time during cultivation in a bioreactor

зился с 95,7 до 86,2 %, процент мертвых увеличился с 0,5 до 2,9 %, в ALD – с 3,9 и до 10,9 %. В данном эксперименте при оптимальных условиях культивирования с 4-го часа индукции процент клеток всех популяций стабилизировался и достиг плато.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика оценки жизнеспособности *E. coli* с использованием проточной цитометрии и окрашивания клеток пропидия йодидом и аннексином V. Проведена валидация методики по параметрам «сходимость», «линейность», «специфичность», «правильность», «предел количественного определения», «аналитическая область», «внутрилабораторная прецизионность». Результаты валидационных испытаний находятся в рамках критериев приемлемости. Методика показала свою эффективность для оценки жизнеспособности клеток при создании банков клеток *E. coli*. Контроль жизнеспособности позволяет своевременно выявлять и устранять причины снижения качества клеточных банков, что критично для обеспечения воспроизводимости и эффективности производства рекомбинантных белков. Внедрение методики на этапах разработки технологии культивирования дало возможность оперативно принимать корректирующие меры в процессе культивирования, что способствует стабильности технологического процесса и повышению выхода целевого продукта.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Rösner L. S., Walter F., Ude C., John G. T., Beutel S. Sensors and Techniques for On-Line Determination of Cell Viability in Bioprocess Monitoring. *Bioengineering*. 2022;9(12):762. DOI: 10.3390/bioengineering9120762.
- Meyer C. T., Lynch G. K., Stamo D. F., Miller E. J., Chatterjee A., Kralj J. M. A high-throughput and low-waste viability assay for microbes. *Nature Microbiology*. 2023;8(12):2304–2314. DOI: 10.1038/s41564-023-01513-9.
- Martini K. M., Boddu S. S., Nemenman I., Vega N. M. Maximum likelihood estimators for colony-forming units. *Microbiology Spectrum*. 2024;12:e03946-23. DOI: 10.1128/spectrum.03946-23.
- Śliwa-Dominiak J., Czechowska K., Blanco A., Sielatycka K., Radaczyńska M., Skonieczna-Żydecka K., Marlicz W., Łoniewski I. Flow Cytometry in Microbiology: A Review of the Current State in Microbiome Research, Probiotics, and Industrial Manufacturing. *Cytometry Part A*. 2025;107(3):145–164. DOI: 10.1002/cyto.a.24920.
- Agus R., Avino F., Lavrikova A., Myers B., Furno I. Flow cytometry study of *Escherichia coli* treated with plasma-activated water: confirming the absence of the viable but non-culturable state in bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2025;16:1592471. DOI: 10.3389/fmicb.2025.1592471.
- McEvoy B., Lynch M., Rowan N. J. Opportunities for the application of real-time bacterial cell analysis using flow cytometry for the advancement of sterilization microbiology. *Journal of Applied Microbiology*. 2021;130(6):1794–1812. DOI: 10.1111/jam.14876.
- Teixeira P., Fernandes B., Silva A. M., Dias N., Azeredo J. Evaluation by Flow Cytometry of *Escherichia coli* Viability in Lettuce after Disinfection. *Antibiotics*. 2020;9(1):14. DOI: 10.3390/antibiotics9010014.
- Vanhauteghem D., Audenaert K., Demeyere K., Hoogenboom F., Janssens G. P. J., Meyer E. Flow cytometry, a powerful novel tool to rapidly assess bacterial viability in metal working fluids: Proof-of-principle. *PLoS ONE*. 2019;14(2):e0211583. DOI: 10.1371/journal.pone.0211583.
- Ou F., McGoverin C., Swift S., Vanholsbeeck F. Absolute bacterial cell enumeration using flow cytometry. *Journal of Applied Microbiology*. 2017;123(2):464–477. DOI: 10.1111/jam.13508.
- Davey H., Guyot S. Estimation of Microbial Viability Using Flow Cytometry. *Current Protocols in Cytometry*. 2020;93(1):e72. DOI: 10.1002/cpcy.72.
- Léonard L., Chibane L. B., Bouhedda B. O., Degraeve P., Oulahal N. Recent Advances on Multi-Parameter Flow Cytometry to Characterize Antimicrobial Treatments. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:1225. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01225.

12. Lakshmanan I., Batra S.K. Protocol for Apoptosis Assay by Flow Cytometry Using Annexin V Staining Method. *BIO-PROTOCOL*. 2013;3(6):e374. DOI: 10.21769/bioprotoc.374.
13. Rieger A. M., Nelson K. L., Konowalchuk J. D., Barreda D. R. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of Visualized Experiments*. 2011;(50):2597. DOI: 10.3791/2597.
14. Han G., Lee D.G. Antibacterial Mode of Action of  $\beta$ -Amyrin Promotes Apoptosis-Like Death in *Escherichia coli* by Producing Reactive Oxygen Species. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2022;32(12):1547–1552. DOI: 10.4014/jmb.2209.09040.
15. Lai M.-J., Huang Y.-W., Chen H.-C., Tsao L.-I., Chang Chien C.-F., Singh B., Liu B. R. Effect of Size and Concentration of Copper Nanoparticles on the Antimicrobial Activity in *Escherichia coli* through Multiple Mechanisms. *Nanomaterials*. 2022;12(21):3715. DOI: 10.3390/nano12213715.
16. Dwyer D. J., Camacho D. M., Kohanski M. A., Callura J. M., Collins J. J. Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis. *Molecular Cell*. 2012;46(5):561–572. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.04.027.
17. Erental A., Sharon I., Engelberg-Kulka H. Two programmed cell death systems in *Escherichia coli*: an apoptotic-like death is inhibited by the mazEF-mediated death pathway. *PLoS Biology*. 2012;10(3):e1001281. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001281.
18. Kwun M. S., Lee D.G. Bacterial Apoptosis-Like Death through Accumulation of Reactive Oxygen Species by Quercetin in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2024;34(7):1395–1400. DOI: 10.4014/jmb.2403.03057.
19. Lin S., Lin Z., Zhou F., Wang D., Zheng B., Hu J. Polyoxometalate  $K_6[P_2Mo_{18}O_{62}]$  Inactivates *Escherichia coli* O157:H7 by Inducing recA Expression and Apoptosis-like Bacterial Death. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(14):11469. DOI: 10.3390/ijms241411469.
20. Choi H., Hwang J.-S., Lee D.G. Coprisin exerts antibacterial effects by inducing apoptosis-like death in *Escherichia coli*. *IUBMB Life*. 2016;68(1):72–8. DOI: 10.1002/iub.1463.
21. Li J., Ma L., Liao X., Liu D., Lu X., Chen S., Ye X., Ding T. Ultrasound-Induced *Escherichia coli* O157:H7 Cell Death Exhibits Physical Disruption and Biochemical Apoptosis. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:2486. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02486.
22. Chen B., Zhao Y., Li Z., Pan J., Wu H., Qiu G., Feng C., Wei C. Immobilization of Phosphatidylserine by Ethanol and Lysozyme on the Cell Surface for Evaluation of Apoptosis-Like Decay in Activated-Sludge Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 2020;86(14):e00345–20. DOI: 10.1128/AEM.00345-20.
23. Sezonov G., Joseleau-Petit D., D'Ari R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*. 2007;189(23):8746–8749. DOI: 10.1128/JB.01368-07.
24. Erental A., Kalderon Z., Saada A., Smith Y., Engelberg-Kulka H. Apoptosis-like death, an extreme SOS response in *Escherichia coli*. *mBio*. 2014;5(4):e01426–14. DOI: 10.1128/mBio.01426-14.