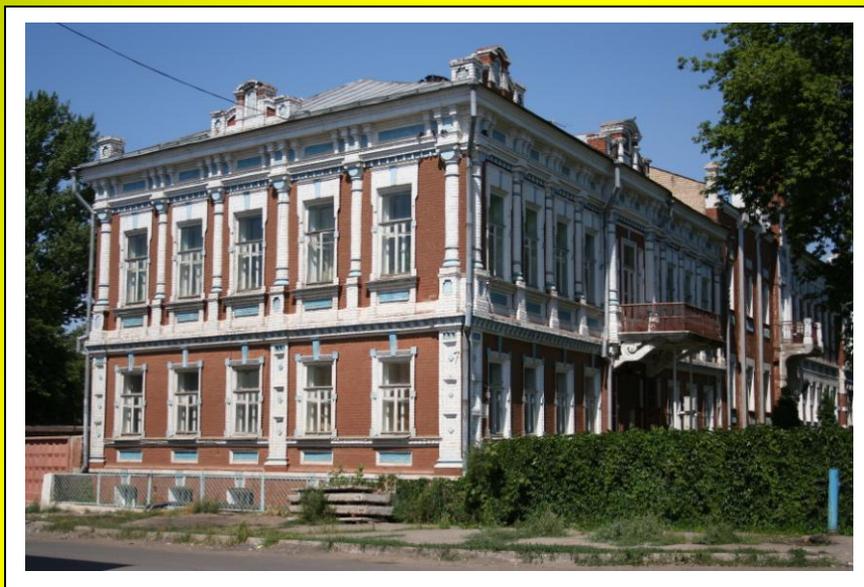


ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)



2013 * № 3

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Коллектив авторов, 2013

УДК: 579.61

Т.М. Уткина¹, Л.П. Потехина¹, О.Л. Карташова¹, А.В. Ткачев²

РЕГУЛЯЦИЯ ПЕРСИСТЕНТНЫХ СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ РАСТИТЕЛЬНЫМИ ЭКСТРАКТАМИ ХВОЙНЫХ РАСТЕНИЙ

¹ Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

² Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия

Цель. Изучить влияние на рост и персистентные свойства условно-патогенных микроорганизмов растительных экстрактов хвойных растений и отобрать наиболее перспективные для использования в качестве вспомогательных средств, пригодных для терапии эндогенных инфекций.

Материалы и методы. Изучено влияние растительных экстрактов хвойных растений: лиственницы сибирской *Larix sibirica* (08-48), ели сибирской *Picea obovata* (08-38; 10-28), пихты сибирской *Abies sibirica* (11-42; 09-02), можжевельника казацкого *Juniperus sabina* (09-20), можжевельника сибирского *Juniperus sibirica* (02-53), сосны сибирской *Pinus sibirica* (11-39; 09-03) на рост и персистентные свойства условно-патогенных микроорганизмов (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* и *Bacillus subtilis*). Антилизоцимную активность микроорганизмов определяли фотометрическим методом, образование биопленок микроорганизмами оценивали по степени связывания ими кристаллического фиолетового в стерильных 96-луночных полистироловых планшетах.

Результаты. Показано, что бактерицидным действием в отношении *K. pneumoniae* обладали экстракты ели сибирской (08-38) и пихты сибирской (11-42), в отношении *S. aureus* – можжевельника казацкого, лиственницы сибирской и ели сибирской (08-38), все изученные растительные экстракты хвойных растений подавляли рост условно-патогенных микроорганизмов. Наиболее эффективно антилизоцимную активность микроорганизмов снижали растительные экстракты можжевельника казацкого, ели сибирской (08-38), пихты сибирской (09-02); их способность к образованию биопленок – растительный экстракт сосны сибирской (11-39).

Заключение. Проведенные исследования позволили отобрать растительные экстракты хвойных растений, обладающие бактерицидным и антиперсистентным действием.

Ключевые слова: условно-патогенные микроорганизмы, антилизоцимная активность, способность к образованию биопленок, растительные экстракты, хвойные растения.

Т.М. Уткина¹, Л.П. Потехина¹, О.Л. Карташова¹, А.В.Ткачев²

REGULATION OF PERSISTENT PROPERTIES OF MICROORGANISMS BY PLANT EXTRACTS OF CONIFEROUS PLANTS

¹ Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

² N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, SB RAS, Novosibirsk, Russia

Aim. To study the influence of plant extracts of coniferous plants on growth and persistent properties of opportunistic microorganisms and to select the most perspective of them as the supportive applications suitable for therapy of endogenic infections.

Materials and methods. The influence of plant extracts (essential oils) of coniferous plants: *Larix sibirica* (08-48), *Picea obovata* (08-38; 10-28), *Abies sibirica* (11-42; 09-02), *Juniperus sabina* (09-20), *Juniperus sibirica* (02-53), *Pinus sibirica* (11-39; 09-03) on growth and persistent properties of opportunistic microorganisms (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Bacillus subtilis*) were studied. Antilysozyme activity of microorganisms was determined by a photometric method, formation of biofilms was estimated on extent of binding by them crystalline violet in sterile 96-cup polystyrene tablets.

Results. It is shown that bactericidal action concerning *K. pneumoniae* extracts of *Picea obovata* (08-38) and *Abies sibirica* (11-42), concerning *S. aureus* – a *Juniperus Sabina*, *Larix sibirica* and *Picea obovata* (08-38) possessed, all studied plant extracts of coniferous plants suppressed growth of opportunistic microorganisms. Most effectively antilysozyme activity of microorganisms was suppressed by *Juniperus Sabina*, *Picea obovata* (08-38), *Abies sibirica* (09-02); the ability to form biofilms – by *Pinus sibirica* (11-39).

Conclusion. The conducted researches allowed to select the plant extracts of coniferous plants possessing bactericidal and antipersistent action.

Keywords: opportunistic microorganisms, antilysozyme activity, ability to form biofilms, plant extracts, coniferous plants.

Введение

Известно, что персистентный потенциал условно-патогенных микроорганизмов, вызывающих инфекционно-воспалительные заболевания, влияет на длительность их переживания в макроорганизме [1, 2, 3], а подавление персистентного потенциала лекарственными препаратами позволяет значительно расширить их круг [4].

В настоящее время внимание исследователей привлекают лекарственные растения, экстракты из которых не только обладают бактерицидной активностью, но и подавляют персистентный потенциал патогенов [5, 6, 7], что затрудняет их паразитирование в организме хозяина и способствует быстрой элиминации из очага воспаления [8].

Несомненный интерес представляет изучение растительных экстрактов, полученных из хвойных растений, которые характеризуются высокой биологической активностью. Известно, что эфирные масла хвойных растений оказывают противовоспалительное и бактерицидное действие, используются при заживлении ран и при лечении гнойных поражений кожи [9, 10, 11]. В то же время не изучено влияние растительных экстрактов хвойных растений на персистентные свойства условно-патогенных микроорганизмов.

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение влияния растительных экстрактов хвойных растений на рост и персистентные свойства условно-патогенных микроорганизмов и отбор наиболее перспективных для

использования в качестве вспомогательных средств, пригодных для терапии эндогенных инфекций.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили:

- растительные экстракты (эфирные масла) хвойных растений: лиственницы сибирской *Larix sibirica* (08-48), ели сибирской *Picea obovata* (08-38; 10-28), пихты сибирской *Abies sibirica* (11-42; 09-02), можжевельника казацкого *Juniperus Sabina* (09-20), можжевельника сибирского *Juniperus sibirica* (02-53), сосны сибирской *Pinus sibirica* (11-39; 09-03), полученных из свеже-собранного растительного сырья методом пародистилляции в ходе экспедиционных исследований в различных регионах Южной Сибири в лаборатории терпеновых соединений Новосибирского института органической химии им. Н.Н.Ворожцова СО РАН (зав. лабораторией д.х.н., профессор Ткачев А.В.) и предоставленных нам под лабораторными шифрами, каждый из которых является уникальным идентификатором образца, связывающим все характеристики и спектрально-аналитические данные с видовой принадлежностью, точными географическими координатами сбора и экологической приуроченностью исследуемого вида растения;

- условно-патогенные микроорганизмы *Klebsiella pneumoniae* ($n=6$), *Escherichia coli* ($n=6$), *Staphylococcus aureus* ($n=6$), *Candida albicans* ($n=6$), *Bacillus subtilis* ($n=6$), выделенные от больных инфекционно-воспалительными заболеваниями. Идентификацию микроорганизмов проводили общепринятыми методами на основании морфологических, тинкториальных и биохимических свойств с использованием ENTEROtest, STAPHYtest («LACHEMA», Чехия), Bacillus-ID («Microgen Bioproducts», Великобритания). Выделение и идентификацию грибов рода *Candida* проводили согласно методикам [12].

Антибактериальную активность растительных экстрактов определяли по [13]. Антилизозимную активность (АЛА) микроорганизмов определяли фотометрическим методом [8]. Образование биопленок микроорганизмами оценивали по степени связывания ими кристаллического фиолетового в стерильных 96-луночных полистироловых планшетах [14]. Изучение регуляции факторов персистенции исследуемыми эфирными маслами осуществляли по

[15]. Эффект регуляции персистентных свойств микроорганизмов являлся существенным, если под воздействием эфирных масел происходило их снижение на 20% и более, а от 0 до 20% - индифферентным [16].

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований была определена антимикробная активность растительных экстрактов (РЭ) хвойных растений (табл. 1).

Таблица 1. Антимикробная активность растительных экстрактов хвойных растений

Микроорганизмы	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
Эфирные масла					
Контроль (КОЕ/мл)	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$
11-39 <i>Pinus sibirica</i> Сосна сибирская	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^3$
09-03 <i>Pinus sibirica</i> Сосна сибирская	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^3$
02-53 <i>Juniperus sibirica</i> Можжевельник сибирский	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^3$
09-20 <i>Juniperus sabina</i> Можжевельник казацкий	$1 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^7$	Роста нет	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^3$
08-48 <i>Larix sibirica</i> Лиственница сибирская	$5 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5$	Роста нет	$5 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^3$
08-38 <i>Picea obovata</i> Ель сибирская	$1 \cdot 10^3$	Роста нет	Роста нет	$5 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^7$
10-28 <i>Picea obovata</i> Ель сибирская	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^4$
11-42 <i>Abies sibirica</i> Пихта сибирская	$1 \cdot 10^3$	Роста нет	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^3$
09-02 <i>Abies sibirica</i> Пихта сибирская	$5 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^3$

Установлено бактерицидное действие РЭ ели сибирской (08-38) и пихты сибирской (11-42) в отношении *K. pneumoniae*; РЭ экстрактов можжевельника казацкого, лиственницы сибирской и ели сибирской (08-38) в отношении *S. aureus*.

Бактериостатическое действие на штаммы *E. coli* оказывали РЭ можжевельника казацкого, ели сибирской (08-38, 10-28) и пихты сибирской (11-42), снижая число выросших колоний с $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл до $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл.

Незначительно (с $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл до $5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл) подавляли рост *B. subtilis* РЭ лиственницы сибирской (08-48), ели сибирской (08-38; 10-28) и

пихты сибирской (09-02), тогда как РЭ можжевельника казацкого и пихты сибирской (11-42) не оказывали влияния на рост бацилл.

Наиболее эффективно (с $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл до $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл) подавляли рост *S. albicans* РЭ сосны сибирской (11-39, 09-03) и можжевельника сибирского.

Далее было изучено влияние растительных экстрактов хвойных растений на антилизоцимную активность микроорганизмов и установлено их разнонаправленное действие: ингибирующее, индифферентное и стимулирующее (табл. 2).

Так, уровень АЛА *E. coli* наиболее эффективно (на 60% и более) снижали РЭ сосны сибирской (09-03), можжевельника казацкого, ели сибирской (08-38) и пихты сибирской (09-02), на 20-40% - РЭ можжевельника сибирского, тогда как РЭ сосны сибирской (11-39), лиственницы сибирской, ели сибирской (10-28) и пихты сибирской (11-42) не оказывали влияния на способность кишечной палочки инактивировать лизоцим.

Все изученные растительные экстракты снижали АЛА *K. pneumonia* на 60% и более, за исключением РЭ сосны сибирской (09-03), который снижал признак на 40-60%.

Антилизоцимную активность *S. aureus* на 60% и более снижали РЭ сосны сибирской (11-39; 09-03), можжевельника казацкого и пихты сибирской (09-02); на 20-40% - РЭ ели сибирской (10-28), РЭ пихты сибирской (11-42) оказывал индифферентное действие.

Способность к инаktivации лизоцима *B. subtilis* на 60% и более подавляли РЭ сосны сибирской (11-39), можжевельника казацкого, лиственницы сибирской, ели сибирской (08-38) и пихты сибирской (09-02), на 20-40% подавлял признак РЭ сосны сибирской (09-03). РЭ можжевельника сибирского, пихты сибирской (11-42) и ели сибирской (10-28) не оказывали влияния на АЛА бацилл.

При изучении влияния растительных экстрактов на антилизоцимную активность *S. albicans* установлено, что РЭ сосны сибирской (09-03), можжевельника казацкого, лиственницы сибирской и ели сибирской (08-38) подавляли признак на 60% и более, РЭ сосны сибирской (11-39), можжевельника сибирского и ели сибирской (10-28) на 40-60%, РЭ пихты сибирской (09-02)

на 20-40%. РЭ пихты сибирской (11-42) стимулировал способность к инактивации лизоцима *C. albicans* на 40-60%.

Таблица 2. Влияние растительных экстрактов хвойных растений на антилизоцимную активность микроорганизмов

Микроорганизмы Эфирное масло	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
Контроль мкг/мл*ОП	0,62±0,02	1,2±0,001	1±0,1	0,89±0,01	0,45±0,01
11-39 <i>Pinus sibirica</i> Сосна сибирская	0	-3	-3	-3	-2
09-03 <i>Pinus sibirica</i> Сосна сибирская	-3	-2	-3	-1	-3
02-53 <i>Juniperus sibirica</i> Можжевельник сибирский	-2	-3	-3	0	-2
09-20 <i>Juniperus sabina</i> Можжевельник казацкий	-3	-3	Роста нет	-3	-3
08-48 <i>Larix sibirica</i> Лиственница сибирская	0	-3	Роста нет	-3	-3
08-38 <i>Picea obovata</i> Ель сибирская	-3	Роста нет	Роста нет	-3	-3
10-28 <i>Picea obovata</i> Ель сибирская	0	-3	-2	0	-2
11-42 <i>Abies sibirica</i> Пихта сибирская	0	Роста нет	0	0	+2
09-02 <i>Abies sibirica</i> Пихта сибирская	-3	-3	-3	-3	-1

Примечание: «0» - изменение антилизоцимной активности на 0-20%; «1» - на 20-40%; «2» - на 40-60%; «3» - на 60% и более; «-» - подавляющее действие; «+» - стимулирующее действие.

Далее было изучено влияние РЭ хвойных растений на способность микроорганизмов образовывать биопленки (ОБ) и установлено их разнонаправленное действие: индифферентное, стимулирующее и ингибирующее (табл. 3).

РЭ сосны сибирской (09-03), можжевельника сибирского, можжевельника казацкого, ели сибирской (08-38, 10-28) и пихты сибирской (11-42) не оказывали влияния на ОБ *E. coli*. Под влиянием РЭ сосны сибирской (11-39), лиственницы сибирской и пихты сибирской (09-02) кишечная палочка утрачивала данную способность.

РЭ можжевельника казацкого, ели сибирской (10-28) и пихты сибир-

ской (09-02) оказывали индифферентное действие на образование биопленок *K. pneumoniae*. РЭ лиственницы сибирской подавлял ОБ клебсиеллами на 40-60%, РЭ сосны сибирской (09-03) и можжевельника сибирского – на 60% и более. Влияние РЭ сосны сибирской (11-39) на ОБ *K. pneumoniae* способствовало утрате признака.

Таблица 3. Влияние растительных экстрактов хвойных растений на образование биопленок микроорганизмами

Микроорганизмы Эфирное масло	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
Контроль (у. е.)	01,1±0,03	12,9±0,007	1,4±0,1	1,6±0,4	1,1±0,02
11-39 <i>Pinus sibirica</i> Сосна сибирская	---	---	---	---	---
09-03 <i>Pinus sibirica</i> Сосна сибирская	0	-3	---	0	---
02-53 <i>Juniperus sibirica</i> Можжевельник сибирский	0	-3	---	0	0
09-20 <i>Juniperus sibirica</i> Можжевельник казацкий	0	0	Роста нет	-3	-3
08-48 <i>Larix sibirica</i> Лиственница сибирская	---	-2	Роста нет	+3	-3
08-38 <i>Picea obovata</i> Ель сибирская	0	Роста нет	Роста нет	0	-3
10-28 <i>Picea obovata</i> Ель сибирская	0	0	0	+3	---
11-42 <i>Abies sibirica</i> Пихта сибирская	0	Роста нет	0	-1	-3
09-02 <i>Abies sibirica</i> Пихта сибирская	---	0	---	-1	-3

Примечание: «0» - изменение пленкообразования микроорганизмами на 0-20%; «1» - на 20-40%; «2» - на 40-60%; «3» - на 60% и более; «-» - подавляющее действие, «+» - стимулирующее действие, «---» - отсутствие признака.

Под действием всех изученных растительных экстрактов хвойных растений *S. aureus* переставали формировать биопленки, тогда как экстракты ели сибирской (10-28) и пихты сибирской (11-42) оказывали индифферентное действие на ОБ золотистыми стафилококками.

РЭ сосны сибирской (09-03), можжевельника сибирского и ели сибирской (08-38) не оказывали влияния на ОБ *B. subtilis*. Под действием РЭ лиственницы сибирской и ели сибирской (10-28) ОБ бациллами увеличивалось на 100%. РЭ можжевельника казацкого снижал изученный признак на 60% и

более, РЭ пихты сибирской (11-42, 09-02) - на 20-40%. Под влиянием РЭ сосны сибирской (11-39) *V. subtilis* утрачивали эту способность.

РЭ можжевельника казацкого, лиственницы сибирской, ели сибирской (08-38) и пихты сибирской (11-42, 09-02) снижали ОБ *S. albicans* на 60% и более. РЭ можжевельника сибирского не оказывал влияния на ОБ грибами, а под действием РЭ сосны сибирской (11-39, 09-03) и ели сибирской (10-28) утрачивали способность образовывать биопленки.

Заключение

Снижение эффективности антимикробных препаратов, появление антибиотикорезистентных штаммов обуславливает необходимость поиска новых путей борьбы с персистирующими патогенами [8]. В настоящее время одним из перспективных направлений является разработка препаратов на основе растительного сырья. В условиях эксперимента *in vitro* показано, что лекарственные растения обладают высоким потенциалом подавления антилизоцимной активности условно-патогенных микроорганизмов [5]. Установлено, что лекарственные растения, богатые антиоксидантами (флавоноиды, каротиноиды, витамины А и Е) эффективно подавляют АЛА энтеробактерий [6]. При изучении растительных фитосубстанций, содержащих флавоноиды и фенилпропаноиды, определена вторая фракция углекислотного экстракта гвоздики, обладающая высокой антиперсистентной активностью [17].

Проведенные нами исследования позволили оценить влияние растительных экстрактов хвойных растений на рост и персистентные свойства условно-патогенных микроорганизмов, отобрать среди них, обладающие бактерицидной активностью и характеризующиеся эффективным антиперсистентным действием, которые могут быть перспективными для использования в качестве вспомогательных средств, пригодных для терапии эндогенных инфекций.

(Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований УрО РАН, проект № 12-С-4-1022 «Регуляция биологических свойств микроорганизмов растительными экстрактами как основа разработки антибактериальных средств»)

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамзон О.М., Вальшев А.В., Карташова О.Л. и др. Этиологическая характеристика острых абсцессов и нагноительных процессов легких и плевры. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2003. 5 (1): 10.
2. Глазева С.А. Роль микробного фактора в течении осложненных форм рожистого воспаления: Автореф. дис. канд. мед. наук. Оренбург, 2008. 32 с.

3. Потехина Л.П., Карташова О.Л., Уткина Т.М. и др. Таксономическая структура микрофлоры, колонизирующей венозные трофические язвы и ее персистентные свойства [Электронный носитель]. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. Url: [http://elmag.uran.ru/magazine/Numbers/2012-3%20/Articles/11Potehina\(2012-3\).pdf](http://elmag.uran.ru/magazine/Numbers/2012-3%20/Articles/11Potehina(2012-3).pdf).
4. Бухарин О.В. Проблемы персистенции патогенов в инфектологии. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2006. 4: 4-8.
5. Бухарин О.В., Челпаченко О.Е., Усвяцов Б.Я. и др. Влияние лекарственных растений на антилизоцимную активность микроорганизмов. Антибиотики и химиотерапия. 2003. 5: 11-14.
6. Тарасевич А.В. Регуляция антилизоцимной активности энтеробактерий эндогенными факторами желудочно-кишечного тракта и разработка рациональных подходов к диагностике и коррекции дисбиоза кишечника: Автореф. канд. мед. наук. Оренбург, 2004. 22 с.
7. Куркин В.А. Создание и стандартизация фитопрепаратов на основе лекарственных растений, содержащих флавоноиды и фенилпропаноиды. Материалы симпозиума «Фундаментальные науки новым лекарствам». Москва, 2008. 106-107.
8. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина, 1999. 366 с.
9. Ефремов Е.А., Ефремов А.А. Компонентный состав эфирного масла октябрьской лапки пихты сибирской Красноярского края. Химия растительного сырья. 2010. 3: 121-124.
10. Аешина Е.Н., Величко Н.А. Исследование особенностей химического состава эфирных масел двух видов рода *Juniperus*. Химия растительного сырья. 2004. 4: 35-37.
11. Лоулес Д. Энциклопедия ароматических масел. М., 2000. 287 с.
12. Реброва Р.Н. Грибы рода *Candida* при заболеваниях негрибковой этиологии. М.: Медицина, 1989. 128 с.
13. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина, 1982. 464 с.
14. O'Toole G.A., Kaplan A.H., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Ann. Rev. Microbiol. 2000. 4: 49-76.
15. Кириллов Д.А. Лекарственная регуляция персистентных свойств микроорганизмов: Автореф. дис. канд. мед. наук. Оренбург, 2004. 22 с.
16. Шеенков Н.В. Роль антилизоцимной активности бактерий в развитии инфекционного процесса и пути ее регуляции. Автореф. дис. канд. мед. наук. Челябинск, 1993. 24 с.
17. Карташова О.Л., Уткина Т.М., Жестков А.В. и др. Влияние фитосубстанций, обладающих антиоксидантной активностью, на персистентные свойства микроорганизмов. Антибиотики и химиотерапия. 2009. 54 (9-10): 16-18.

Поступила 21 октября 2013 г.

(Контактная информация: **Уткина Татьяна Михайловна** – к.б.н., с.н.с. лаборатории по изучению механизмов и регуляции персистенции бактерий Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, ИКВС УрО РАН, тел. (3532)774463, e-mail: labpersist@mail.ru)