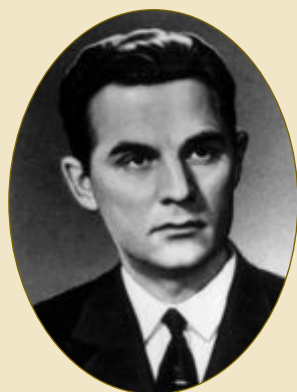


· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

· КОЛЬЦОВ · ШРЕДИНГЕР · ЭЙВЕРИ · ЧАРГАФФ · УОТСОН · КРИК ·

**ВЕСТНИК**  
**биотехнологии**  
**и физико-химической**  
**биологии**  
**имени Ю.А. Овчинникова**



**Т. 2, № 2**  
**2006**

· КОРНБЕРГ · НИРЕНБЕРГ · КОРАНА · ТЕМИН · БАЛТИМОР · БАЕВ ·

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРДТ ·

2006, Т. 2, № 2

**ВЕСТНИК БИОТЕХНОЛОГИИ  
И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ  
ИМЕНИ Ю.А. ОВЧИННИКОВА**

**Научно-практический журнал**

**Основан в 2005 году**

**Главный редактор**

Р.Г. Василев

**Редакционная коллегия**

Е.Г. Борисенко, В.С. Воробьев, С.И. Матаев, Ю.В. Махотин, О.Я. Мезенова

**Редакционный совет**

В.А. Быков (Москва), В.А. Вахитов (Уфа), А.А. Воробьев (Москва),  
В.Г. Дебабов (Москва), В.В. Эверев (Москва), А.И. Иваненко (Москва),  
В.Т. Иванов (Москва), Л.В. Калакуцкий (Пушино), М.П. Кирпичников (Москва),  
О.И. Киселев (Санкт-Петербург), А.И. Мирошников (Москва), Т.В. Овчинникова (Москва),  
О.Н. Озолинь (Пушино), Е.Н. Орешкин (Москва), А.Н. Панин (Москва),  
Е.В. Пименов (Киров), В.О. Попов (Москва), Л.С. Сандахчиев (Новосибирск),  
К.Г. Скрябин (Москва), Г. Хаммерлинг (Германия), Р.М. Хаитов (Москва),  
В.И. Швец (Москва), Н.К. Янковский (Москва)

Журнал зарегистрирован в Россохранкультуре  
Рег. ПИ № ФС77-19745 от 11 апреля 2005 г.

Зав. редакцией О.В. Воробьева  
Адрес: 119296 Москва, Университетский пр-т, 9  
Тел.: 8-916-640-76-18, 8-903-143-99-14  
E-mail: obr@biorosinfo.ru, ptashka095@rambler.ru

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр  
медико-социальных проблем»  
Адрес: 127581 Москва, Керамический проезд, 53, кор. 1  
Тел.: 8-916-251-64-13  
E-mail: raifvasilov@hotmail.com

*Издается при поддержке  
Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова*

© Информационно-аналитический центр  
медико-социальных проблем, 2006.

СОДЕРЖАНИЕ

**Колонка главного редактора**

К читателям. *Р.Г. Василев* ..... 4

**Оригинальные статьи**

Разработка лекарственного препарата Дельтаферон на основе аналога рекомбинантного гамма-интерферона человека. *П.Н. Мирошников, Л.Р. Лебедев* ..... 5

Синтезированный в *E. coli* лектин гороха посевного (PSL) способен инициировать клубенькообразование на люцерне посевной при ее инокуляции *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.  
*И.И. Губайдуллин, Ал.Х. Баймиев, Ан.Х. Баймиев, А.В. Чемерис, В.А. Вахитов* ..... 11

АТР-зависимый транспорт сукцината в везикулы плазматических мембран дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. *В.В. Петров* ..... 17

Особенности полиморфизма генов HLA II класса у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта. *Е.Н. Николаева, В.Н. Царев, Е.А. Горбачева, Е.В. Ипполитов, Т.Н. Царева* ..... 21

Новая сайт-специфическая эндонуклеаза AbsI из *Arthrobacter species* 7M06 узнает октануклеотидную палиндромную последовательность ДНК 5'-CC<sup>^</sup>TCCGAGG-3'.  
*В.А. Чернухин, Ю.Г. Каширина, Ю.Э. Томилова, Д.А. Гончар, В.С. Дедков, Н.А. Михненко, С.Х. Дегтярев* ..... 29

Ускорение процесса биотермической санации и последующего компостирования твердых коммунальных отходов при механизированной переработке.  
*А.В. Гарабаджиу, В.А. Галынкин, Г.В. Козлов, Г.Г. Няникова* ..... 35

**Краткие сообщения**

Повышение антимикробной активности цефалоспоринов препаратами РНК.  
*Т.А. Терещенко, Г.М. Левагина, В.И. Масычева, А.О. Белкина* ..... 41

**Обзоры**

Клонирование и экспрессия генов в молекулярных колониях.  
*Т.Р. Саматов, Е.В. Четверина, А.Б. Четверин* ..... 45

Концепция создания международной коалиционной программы по биобезопасности.  
*А.А. Воробьев, В.И. Евстигнеев, Е.В. Пименов, Р.Г. Василев, В.В. Кутырев* ..... 50

Врожденный иммунитет и защита от патогенов. *Б.Ф. Семенов* ..... 54

Вакцинопрофилактика: прошлое, настоящее, будущее. *В.В. Зверев* ..... 58

**Страницы истории**

К 50-летию важной вехи в развитии молекулярной биологии — открытия Артуром Корнбергом ДНК-полимеразы. *В.С. Воробьев, О.В. Воробьева* ..... 63

Юбилейные и знаменательные даты 2006 года ..... 68

**Хроника**

События первого полугодия 2006 года ..... 70

**Информация**

Предстоящие мероприятия 2006 года ..... 85

**Правила для авторов** ..... 86

**CONTENTS**

**Column of the editor-in-chief**

To readers. *R.G. Vasilov* ..... 4

**Original articles**

The development of the drug Deltaferon on the basis of the recombinant human gamma-interferon analogue.  
*P.N. Miroshnikov, L.R. Lebedev* ..... 5

The synthesized in *E. coli* pea lectin (PSL) is capable to initiate a nodulation of alfalfa pretreated by  
*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.  
*I.I. Gubaydullin, Al.Kh. Baymiev, An.Kh. Baymiev, A.V. Chemeris, V.A. Vakhitov* ..... 11

ATP-dependent transport of succinate into plasmatic membrane vesicles of yeast *Saccharomyces cerevisiae*.  
*V.V. Petrov* ..... 17

Features of HLA class II genes polymorphism in patients with inflammatory diseases of the parodontium.  
*E.N. Nikolayeva, V.N. Tsarev, E.A. Gorbacheva, E.V. Ippolitov, T.N. Tsareva* ..... 21

New eight bases cutter *AbsI* from *Arthrobacter* species recognizes palindromic DNA sequence  
5'-CC<sup>^</sup>TCGAGG-3'.  
*V.A. Chernukhin, Ju.G. Kashirina, Ju.E. Tomilova, D.A. Gonchar, V.S. Dedkov, N.A. Mikhnenkova,  
S.Kh. Degtyarev* ..... 29

An acceleration of the bioterm sanitation process and following composting of the hard everyday rubbish  
in the time of mechanized treatment.  
*A.V. Garabadgiu, V.A. Galinkin, G.V. Kozlov, G.G. Nanikova* ..... 35

**Short communications**

Enhancement of antimicrobial activity of cephalosporins by RNA preparations.  
*T.A. Tereshchenko, G.M. Levagina, V.I. Masycheva, A.O. Belkina* ..... 41

**Reviews**

Cloning and expression of genes in molecular colonies.  
*T.R. Samatov, H.V. Chetverina, A.B. Chetverin* ..... 45

The concept of creation of the international coalition program on biosafety.  
*A.A. Vorobyev, V.I. Yevstigneyev, E.V. Pimenov, R.G. Vasilov, V.V. Kuttyrev* ..... 50

Innate immunity and protection from pathogens. *B.F. Semenov* ..... 54

Vaccinoprophylaxis: the past, present, the future. *V.V. Zverev* ..... 58

**Pages of history**

To 50<sup>th</sup> anniversary of the important milestone in the development of molecular biology – a discovery  
of DNA polymerase by Arthur Kornberg. *V.S. Vorobyev, O.V. Vorobyeva* ..... 63

Anniversary and significant dates 2006 ..... 68

**The chronicle**

Events of the first half-year 2006 ..... 70

**The information**

Forthcoming actions 2006 ..... 85

**Rules for authors** ..... 86

## К читателям

Второй номер журнала за 2006 год готовился к печати, когда в конце марта пришла скорбная весть о неожиданной смерти от тяжелой непродолжительной болезни президента Общества биотехнологов России имени Ю.А. Овчинникова, члена редакционного совета нашего журнала, академика РАМН Анатолия Андреевича Воробьева. Это большая потеря для энтузиастов, объединившихся в последнее время с целью возрождения былой славы отечественной биотехнологии. За два с небольшим года было сделано много, но из команды ушел лидер, мудрый наставник и прекрасный русский, широкой души человек. Его будет очень не хватать всем оставшимся при дальнейшем движении вперед.

Отдавая дань уважения памяти А.А. Воробьева, редколлегия помещает некролог о нем, публикует его доклад по проблеме биобезопасности на III съезде Общества биотехнологов в октябре 2005 г. и представляет информационные материалы о «лебединой песне» покойного ученого — задуманной им незадолго перед кончиной конференции по биобезопасности, которую провели уже его ученики и товарищи в начале июня в отсутствие инициатора в его любимом городе — Санкт-Петербурге, где он учился в 40-е годы в Военно-морской медицинской академии. Печатаются в этой связи и доклады на данной конференции двух академиков РАМН — ученика и преемника на кафедре Анатолия Андреевича В.В. Зверева и коллеги и друга Б.Ф. Семенова.

В номере традиционно выдерживается принятая структура оригинальных статей, кратких сообщений и обзоров. На этот раз также дается подборка работ фундаментального и прикладного характера. Высокий методический и аналитический уровень характеризует работу Т.Р. Саматова, Е.В. Четвериной, А.Б. Четверина (Институт белка РАН, Пушкино) о клонировании и экспрессии генов. Очень четкое исследование проведено П.Н. Мирошниковым, Л.Р. Лебедевым из Института медицинской биотехнологии ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирская область) о получении дельтаферона на основе рекомбинантного гамма-интерферона человека. Скрупулезно выполнена работа И.И. Губайдулина с соавт. (Уфимский научный центр РАН), посвященная выяснению роли лектинов у растений. Продолжается публикация цикла исследований по рестриктазам сотрудников НПО «СибЭнзим» (Новосибирск), в котором они делятся своими решениями преемственных задач в этой важной области молекулярной биологии: В.А. Чернухин с коллегами представили данные о новой сайт-специфической эндонуклеазе AbsI из бактерий. О том, как врачи-практики (стоматологи) пытаются применить генетические подходы к выяснению этиопатогенетически трудных проблем медицины, излагается в статье Е.Н. Николаевой и др. из МГМСУ.

Наряду с этим печатается работа профессора А.В. Гарабаджиу с соавт. из Санкт-Петербургского государственного технологического института об опыте применения биотехнологии в плане биодеградации, а точнее: решения задачи утилизации твердых коммунальных отходов с помощью биологических методов. Таков диапазон биотехнологии — от хлебопечения и сыроварения до сверхтонкой биохимии, от решения глобальных экологических проблем до получения новых биологических модификаций и т.д.

Читателям предлагается исторический материал об обстоятельствах обнаружения ДНК-полимеразы Артуром Корнбергом — это знаменательное открытие было сделано 50 лет назад.

В информационно-хроникальном отделе помещены сведения о наиболее интересных мероприятиях по профилю журнала, произошедших в первом полугодии с.г. Особенно хотелось бы обратить внимание на сообщение о состоявшемся в апреле в Бостоне Международном конгрессе «БИО-2006» — беспрецедентном событии в современной биотехнологии, собравшем около 20000 специалистов из разных стран.

**Главный редактор,  
вице-президент Общества биотехнологов России,  
профессор Р.Г. ВАСИЛОВ**

## РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЕЛЬТАФЕРОН НА ОСНОВЕ АНАЛОГА РЕКОМБИНАНТНОГО ГАММА-ИНТЕРФЕРОНА ЧЕЛОВЕКА

П.Н. МИРОШНИКОВ\*, Л.Р. ЛЕБЕДЕВ

*Институт медицинской биотехнологии ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор»,  
Бердск-10, Новосибирская область*

Разработана технология получения препарата Дельтаферон — аналога рекомбинантного гамма-интерферона человека. Получены партии высокоочищенного дельтаферона и исследована их специфическая активность. Оценено содержание высокополимерных примесей в полученных образцах. Созданы экспериментальные лекарственные формы, которые позволяют сохранять белок в нативном состоянии, без потери специфической активности.

*Ключевые слова:* аналог человеческого гамма-интерферона, дельтаферон, рекомбинантные белки, *E. coli*.

Иммунный интерферон (IFN- $\gamma$ ) может рассматриваться в качестве компонента лекарственных средств, предназначенных для лечения вирусных, онкологических и аутоиммунных заболеваний. За рубежом создан ряд лекарственных препаратов на его основе: «Иммунерон» (США), «Иммуномакс» (Япония), «Имукин» (Германия). В России технология получения препарата на основе IFN- $\gamma$  разработана в Институте прикладной микробиологии (г. Протвино Московской обл.), а также в ООО «Фармаклон» (г. Пушкино Московской обл.). Однако отечественные препараты на основе этого белка еще проходят клинические испытания, а зарубежные аналоги имеют высокую цену, обусловленную сложностью производства IFN- $\gamma$  и его повышенной лабильностью. Ранее в НИИ биоинженерии ФГУП ГНЦ ВБ «Вектор» (п.г.т., Кольцово Новосибирской обл.) были проведены работы по получению аналогов IFN- $\gamma$  с улучшенными свойствами. Один из созданных аналогов имел укороченный на 10 аминокислот С-конец молекулы и 3 аминокислотные замены: аргинин<sup>129</sup>-лизин<sup>130</sup>-аргинин<sup>131</sup> на глицин<sup>129</sup>-серин<sup>130</sup>-аланин<sup>131</sup> [1]. Данный белок получил название дельта 10, или дельтаферон. Было показано,

что подобные изменения в белковой молекуле привели к 20-кратной потере антивирусной активности по сравнению с полноразмерным IFN- $\gamma$ , но не сказались на его иммуномодулирующих свойствах [2]. Также в результате данной модификации у дельтаферона появился ряд положительных по сравнению с IFN- $\gamma$  признаков, среди которых наиболее интересными являются его устойчивость к протеолитическим ферментам и микробный биосинтез белка в растворимой форме. Эти свойства сделали дельтаферон удобным объектом для исследования. Данная работа посвящена разработке препаратов на его основе с выраженным терапевтическим эффектом и изучению биохимических свойств.

### Материалы и методы

В работе была использована плаزمиды рIFN- $\Delta$ 10 [1], несущая ген дельтаферона под контролем тандема из *trp*-промоторов в качестве регуляторного элемента. Плазмиды содержат ген устойчивости к тетрациклину (*tet*). В качестве штамма-реципиента использовали *Escherichia coli* МН-1 (*ara-leu* (*araD139*,  $\Delta$ (*ara-leu*) f697,  $\Delta$ *lac* x 74, *gal* U, *gal* K, *hsr*<sup>-</sup>, *hsm*<sup>+</sup>, *strA*), Tc<sup>r</sup> [3]. Трансформацию компетентных клеток проводили кальциевым методом, как описано в [3]. В качестве селективной среды для отбора трансформированных клеток использовали L-агар с добавлением тетрациклина (10 мкг/мл). Ферментацию проводили в колбах на среде М9 [4] с добавлением казаминовых кислот (2 г/л) и тетрациклина (20 мкг/мл), при температуре +37 °С и частоте вращения качалки

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Мирошников Павел Николаевич,  
младший научный сотрудник Института  
медицинской биотехнологии ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
633010 Новосибирская область, г. Бердск-10,  
а/я 112, НИКТИ БАВ  
Тел.: (38341) 5-19-60  
E-mail: pavmir@ngs.ru



160 мин<sup>-1</sup> до конца логарифмической фазы роста. Клетки собирали центрифугированием. Разрушение клеток проводили на ультразвуковом дезинтеграторе с частотой колебания стержня 22 кГц, при температуре суспензии не выше +10–12 °С. Для ионообменной хроматографии на стадии очистки белков использовали КМ-сефарозу (Amersham Biosciences, Швеция).

Электрофорез препаратов в денатурирующих условиях проводили в 15%-ном полиакриламидном геле, как описано в [5]. Вычисление относительного содержания целевого белка осуществляли обработкой полученных электрофореграмм в пакете программы «Gel-pro analyzer Ver. 3.1» (Media Cybernetics Inc. США). Определение концентрации белка проводили по методам [6, 7]. Образцы полученных препаратов были проанализированы на содержание примесных белков и нуклеиновых кислот методами иммуноферментного анализа [8] и молекулярной гибридизации [4]. Примеси эндотоксина определяли по методу [9]. Антивирусную активность препарата, выраженную в подавлении цитопатического действия вируса энцефаломиокардита на культуре диплоидных фибробластов человека, определяли по методу [10].

## Результаты и обсуждение

**Культивирование штамма-продуцента.** Компетентные клетки *E. coli* МН-1 трансформировали плазмидой рIFN-Δ10 с последующим высевом на селективную агаризованную среду. Выросшие колонии трансформированных клеток рассеивали секторами на агаризованную среду, содержащую тетрациклин. Клетки из каждого сектора отбирали микробиологической петлей и анализировали на содержание в них целевого белка. Клетки с наибольшим содержанием целевого белка использовались для получения посевного материала и дальнейшей работы биомассы. Анализ клонов и их отбор по продуктивности позволили стабилизировать процесс получения кондиционной биомассы и повысить в ней содержание дельтаферона. Анализ 3 образцов биомассы представлен на рисунке 1, где видно, что наблюдается стабильная продукция дельтаферона в клетках штамма-продуцента. Относительное содержание дельтаферона составило в среднем 17% от общего клеточного белка

**Выделение и очистка дельтаферона.** Разрушение биомассы клеток, содержащих дельтаферон, проводили ультразвуком сеансами по 20–25 с до снижения оптической плотности суспензии при длине волны 550 нм до 50–60% от исходного значения. Полученную суспензию центрифугировали при 12 тыс. об/мин., при этом

дельтаферон накапливался в супернатанте. На первой стадии очистки дельтаферона применяли ионообменную хроматографию на КМ-сефарозе.

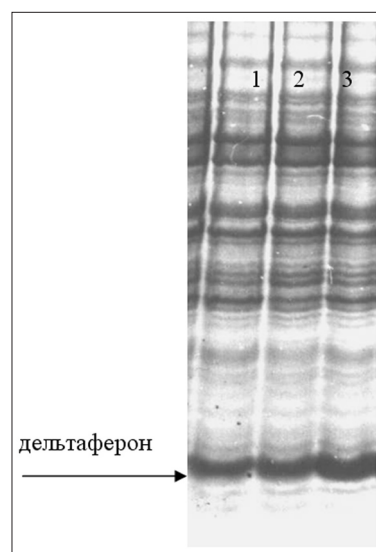


Рис. 1. Электрофоретический анализ образцов биомассы, содержащей рекомбинантный дельтаферон. Номера дорожек соответствуют номеру образца биомассы

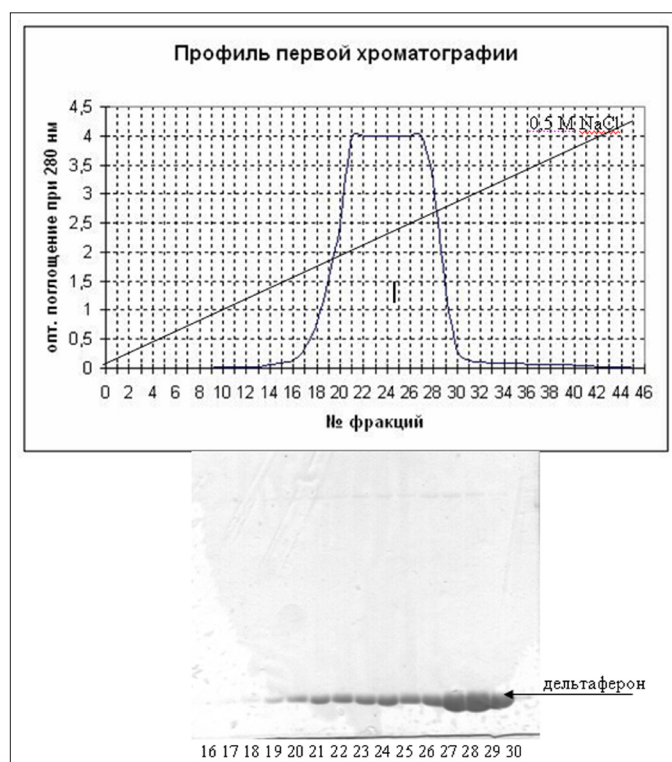


Рис. 2. Профиль первой хроматографии дельтаферона на КМ-сефарозе. Номера дорожек соответствуют номеру фракции

При выбранных условиях дельтаферон практически полностью сорбировался на колонке, в то время как значительная часть балластных белков не была подвержена сорбции и удалялась при отмывке колонки. Для элюции дельтаферона с колонки был разработан состав градиента: 50 мМ Трис, рН 8,3 – 50 мМ цитрат, рН 6,5 с 0,5 М NaCl. Профиль хроматографии и электрофоретический анализ собранных фракций представлен на рисунке 2. Анализ фракций показал, что на этой стадии удалось достигнуть 80% чистоты целевого белка. Дочистку дельтаферона проводили рехроматографией на КМ-сефарозе. Наносимый раствор белка подтитровывали до значения рН 6,3. Элюцию белка осуществляли в градиентах NaCl от 0 до 1,0 М и значении рН от 6,3 до 8,3. Профиль второй хроматографии представлен на рисунке 3. Дельтаферон элюировался с сорбента в виде узкого пика и имел чистоту более 98%. Электрофоретические характеристики конечной субстанции дельтаферона приведены на рисунке 4.

Данные по выделению и очистке белка из 30 г клеток представлены в таблице 1.

**Таблица 1**

**Данные по выделению и очистке дельтаферона**

Стадия очистки	Объем мл	Общий белок		Дельтаферон		Выход %
		мг/мл	Σмг	%	мг	
Экстракт клеток	510	7,5	3825	17,7	677	100
1-я хроматография	70	3,67	256,9	90	231,21	34
2-я хроматография	69	2,75	189	98	185	27,3

Из таблицы видно, что при использовании разработанного способа удается получить из 1 г влажных клеток около 6 мг белка с чистотой не менее 98%. По описанной выше схеме были наработаны 4 серии субстанции дельтаферона. Противовирусная активность препаратов составила не менее 106 Ед./мг белка. Полученные образцы субстанций были проанализированы согласно методам контроля для медицинских и иммунобиологических препаратов, вводимых людям (МУК 4.1/4.2.588-96). Средние значения результатов анализов 4 серий, представленные в таблице 2, свидетельствуют о соответствии дельтаферона по чистоте, по содержанию примесей кле-

точных белков, ДНК и липополисахаридов, указанным в МУК допустимым нормам.

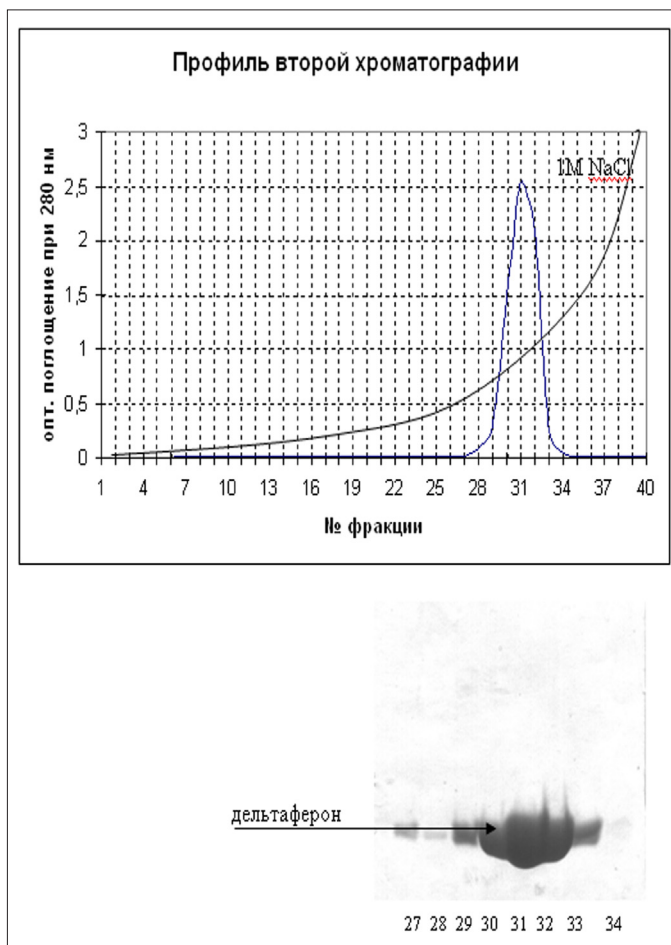


Рис. 3. Профиль повторной хроматографии дельтаферона на КМ-сефарозе. Номера дорожек соответствуют номеру фракции

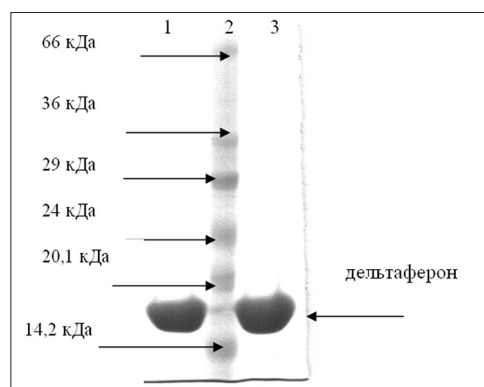


Рис. 4. Электрофоретический анализ субстанции дельтаферона.

1, 3 – дельтаферон (25 и 45 мкг);  
2 – белки-маркеры молекулярной массы



**Таблица 2**  
**Содержание примесных веществ в полученных препаратах**

Показатель	Требования МУК 4.1/4.2.588-96	Дельтаферон (средние значения)
Чистота и гомогенность	не менее 95%	98%
Примеси белков штамма-продукта	не более 200 нг/мг препарата	40 нг/мг препарата
Примеси ДНК штамма-продукта	не более 100 пкг/мг препарата	80 пкг/мг препарата
Примеси липополисахаридов	не более 200 нг/мг препарата	30 нг/мг препарата

#### Разработка лекарственной формы препарата.

Одним из важных этапов при создании медицинского препарата является разработка его лекарственной формы, позволяющая сохранять исходную активность длительное время. Была предложена лекарственная форма дельтаферона, представляющая собой лиофильно высушенный белок с 5%-ным реополиглобулином в качестве наполнителя, а также проведены исследования по выбору условий хранения субстанции и лекарственной формы дельтаферона. На начальном этапе исследования предлагалось хранить субстанцию в замороженном состоянии при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Однако исследования показали, что при последующем размораживании большая часть белка выпадает в осадок, что приводит к потере специфической активности. Было принято решение хранить субстанцию дельтаферона в температурном диапазоне температур от  $0^{\circ}\text{C}$  до  $+5^{\circ}\text{C}$ , избегая замораживания раствора белка. При таком температурном режиме выпадения осадка не наблюдалось в течение 12 мес. Параллельно с субстанцией дельтаферона на хранение в подобных условиях закладывалась лекарственная форма. Образцы субстанции и лекарственной формы в процессе хранения были проанализированы вертикальным SDS-ПААГ электрофорезом.

Картина анализа представлена на рисунке 5. Из приведенного рисунка видно, что наиболее близок к первоначальному состоянию именно белок в лекарственной форме; он образует значительно меньше димерных форм и не подвергается распаду. Субстанция также хранится при выбранных условиях без существенных ухудшений

качества около 6 месяцев. На основании полученных экспериментальных данных было принято решение, хранить полученную субстанцию в растворе не более месяца при температуре не ниже  $0^{\circ}\text{C}$ , после чего либо переводить ее в лекарственную форму, либо сразу после наработки субстанции получать лекарственную форму дельтаферона, что будет способствовать более полному сохранению его первоначальных свойств.



Рис. 5. Электрофоретический анализ образцов субстанции дельтаферона и его лекарственной формы.

- 1 — лек. форма дельтаферона (срок хранения 12 мес.);
- 2 — субстанция дельтаферона (срок хранения 3 мес.);
- 3 — субстанция дельтаферона (срок хранения 6 мес.)

Были проведены также эксперименты по исследованию способности рекомбинантного дельтаферона образовывать мицеллы с полиненасыщенными жирами, в частности, с препаратом витамина А (ретинол ацетат 8,4% масляный раствор по ФС 42-3183-95), чтобы в дальнейшем изучить возможность применения дельтаферона как туберкулоостатика с пероральным способом доставки.

Исследование проводилось методом гель-фильтрации. Профили элюции образцов дельтаферона с витамином А на «Сефакриле S300» представлены на рисунке 6. На нем видно, что более однородный пик дало соотношение белка к витамину А как 5:1, то есть можно сделать вывод, что при данном соотношении происходит наиболее полное связывание белка с ретинол ацетатом и образуется более гомогенная мицеллярная эмульсия.

Об этом свидетельствует также уменьшение значения показателя объема элюции — VR с 6 мл для исходной субстанции дельтаферона до 5,2 мл для эмульсии с соотношением 5:1. Сохранность белка в мицелле оценивалась SDS-ПААГ электрофорезом.

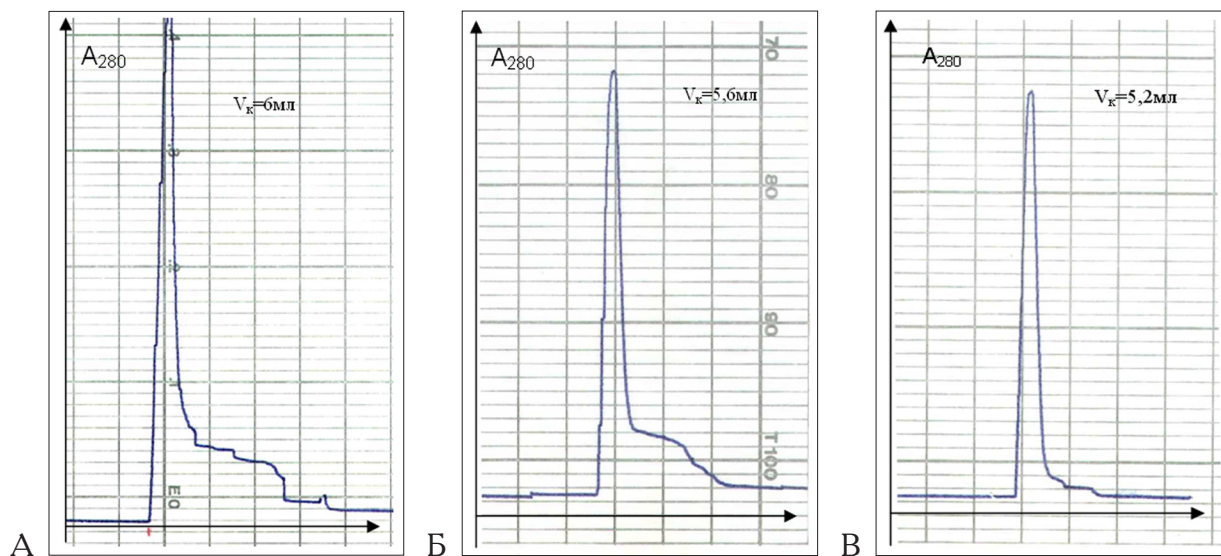


Рис. 6. Профили элюции образцов дельтаферона с витамином А на сефакриле S-300.

- А — исходная субстанция дельтаферона;
- Б — дельтаферон с витамином А (соотношение 10:1);
- В — дельтаферон с витамином А (соотношение 5:1)

Картина электрофореза представлена на рисунке 7, на котором можно видеть, что белок не подвергается деградации в присутствии ретинол ацетата и сохраняет первоначальное состояние.

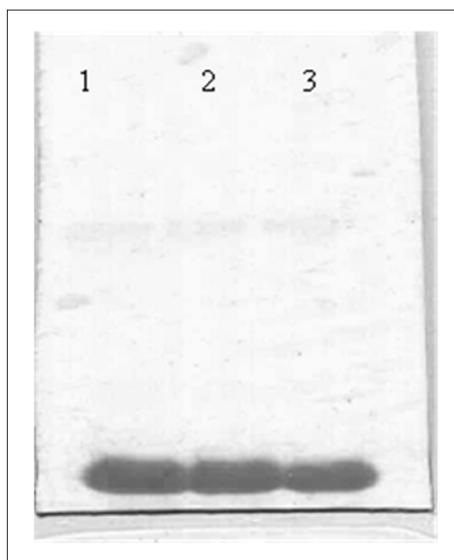


Рис. 7. Электрофоретический анализ образцов дельтаферона с витамином А.

- 1 — исходный дельтаферон;
- 2 — дельтаферон + витамин А (10:1);
- 3 — дельтаферон + витамин А (5:1)

## Заключение

Таким образом, была разработана эффективная схема получения высокоочищенного дельтаферона, основанная на двух последовательных хроматографиях на одном сорбенте, но при разных значениях рН. Данная схема позволяет получать рекомбинантный дельтаферон в препаративных количествах с допустимым содержанием высокополимерных примесей. Были разработаны экспериментальные лекарственные формы дельтаферона, которые позволяют сохранять белок в нативном состоянии без потери специфической активности. Проведены сравнительные биологические испытания лекарственных форм гамма-интерферона и дельтаферона, которые показали, что лекарственная форма дельтаферона обладает присущими исходному гамма-интерферону иммуномодулирующими свойствами (данные не представлены).

*Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Национальная технологическая база».*

*Авторы статьи выражают признательность за помощь в работе сотрудникам НИКТИ БАН ФГУП ГНЦ ВБ «Вектор»: Т.А. Терещенко, Г.М. Сысоевой, С.А. Пьянкову, Т.Н. Гладченко, Т.Ф. Медиковой.*

## Литература

1. Смирнова О. Ю., Татков С. И., Петренко В. А. и др. // Докл. АН. — 1994. — Т. 337. — № 3. — С. 405–406.
2. Татков С. И., Смирнова О. Ю., Цивковский Р. Ю., Ильичев А. А. // Мол. биология. — 1995. — Т. 29. — С. 1095–1101.
3. Casadaban M.J., Cohen S.N. // J. Mol. Biol. — 1980 Apr. — Vol. 138(2). — P. 179–207.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. // Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
5. Laemmli U. K. // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680–685.
6. Spector T. et al. // Anal. Biochem. — 1978. — Vol. 86. — P. 142–146.
7. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. / Справочник биохимика. — М.: Мир, 1991.
8. Новое в клонировании ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера. — М.: Мир, 1989.
9. Денисова Л.Я., Батурина И.И., Закабунин А.И. и др. // Журн микробиол. эпидемиол. и иммунобиологии. — 1999. — № 5. — С. 109–112.
10. Yousefi S., Escobar M.R., Gouldin C.W // Am. J. Clinical Pathol. — 1985. — Vol. 83. — P. 735–740.

## THE DEVELOPMENT OF THE DRUG DELTAFERON ON THE BASIS OF THE RECOMBINANT HUMAN GAMMA-INTERFERON ANALOGUE

P.N. MIROSHNIKOV, L.R. LEBEDEV

*Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector»,  
Berdsk-10, Novosibirsk region*

The technology for production of the drug, Deltaferon, recombinant human gamma-interferon analogue, has been developed. Several experimental of highly purified batches of deltaferon were obtained and their specific activity was studied. The content of highly polymeric contaminants in the samples was estimated. The experimental drug forms maintaining native protein without losing its specific activity were developed.

*Keywords:* human gamma-interferon analogue, deltaferon, recombinant proteins, *E. coli*.

## СИНТЕЗИРОВАННЫЙ В *E. COLI* ЛЕКТИН ГОРОХА ПОСЕВНОГО (PSL) СПОСОБЕН ИНИЦИИРОВАТЬ КЛУБЕНЬКООБРАЗОВАНИЕ НА ЛЮЦЕРНЕ ПОСЕВНОЙ ПРИ ЕЕ ИНОКУЛЯЦИИ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BV. VICIAE*

И.И. ГУБАЙДУЛЛИН\*, А.Х. БАЙМИЕВ, А.Х. БАЙМИЕВ, А.В. ЧЕМЕРИС, В.А. ВАХИТОВ

*Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН*

Клонирован полноразмерный ген лектина гороха посевного. Лектин гороха, синтезированный в штаммах клеток *E. coli* одним полипептидом, в виде пролектина, проявил функциональную активность: при экзогенной обработке им ризобий *R. leguminosarum bv. viciae* в ризосфере люцерны обнаружены неинфицированные большие гроздевидные клубеньки, не наблюдавшиеся в контрольных вариантах без обработки. Таким образом, пролектин гороха PSL, синтезированный в экспрессионной прокариотической системе, сохраняет не только углеводсвязывающие, но также и некоторые свои физиологические свойства, вызывающие специфические реакции клубенькообразования.

*Ключевые слова:* бобово-ризобияльный симбиоз, лектины, *Pisum sativum*.

Роль лектинов бобовых в становлении бобово-ризобияльного симбиоза пока еще до конца не выяснена. На основании ряда полученных результатов по трансформации растений генами лектинов, показавших участие лектина в таких важных симбиотических процессах, как адгезия бактерий к корневой поверхности растений, инфицирование корневых волосков и клубенькообразование [1–5], можно было уже более определенно говорить о роли лектина. Однако остается непонятным, почему в одних случаях интродукция гена лектина в растения приводит к возможности гетерологичной инокуляции ризобиями, а в других — нет.

Здесь следует отметить, что бобовые умеренного климата характеризуются строгой специфичностью к своим микросимбионтам, обуславливая тем самым существование небольшой группы клубеньковых бактерий, из которых растение-хозяин в тех или иных почвенно-климатических условиях не всегда может выбрать наилучшего партнера для симбиоза. Поэтому весьма актуально исследовать

проблему расширения специфичности симбионтов растения-хозяина, которая позволит в перспективе повысить симбиотическую эффективность бобово-ризобияльной системы и, в конечном счете, повысить урожайность сельскохозяйственных бобовых культур.

Исследования симбиотической роли лектинов экспрессией экзогенных лектинов в клетках корней растений довольно сложны, поскольку процедура трансформации бобовых растений представляет собой достаточно трудоемкий процесс. Поэтому параллельно ведутся исследования путем экзогенной обработки лектинами как растений, так и микроорганизмов. Кроме того, довольно сложно выделить лектины в исключительно чистом виде из растительного экстракта, в котором имеются, например, флавоны-активаторы и изофлавоны-ингибиторы, определяющие индукцию ризобияльных генов нодуляции [6] и способные исказить результаты воздействия лектина. В этой связи интересным представляется использование лектинов растений, синтезированных в прокариотических системах. В ряде работ по экспрессии генов лектина бобовых в *E. coli* показано, что синтезируемый при этом белок может связывать сахараиды. Более того, он способен ассоциироваться в димеры и тетрамеры [7–10], что имеет большое значение, поскольку только при олигомеризации субъединиц лектины бобовых проявляют активность в таких процессах, как стимуляция митоза, рецепция гликоконъюгатов, агглютинация клеток и др. [11]. В растительных клетках пролектин гороха в про-

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Губайдуллин Ирек Ильясович,  
к.б.н., сотрудник лаборатории молекулярной биологии  
и биотехнологии Института биохимии и генетики  
Уфимского научного центра РАН  
450054 Уфа, пр-т Октября, 71  
Тел.: (3472) 35-54-79  
Факс: (3472) 35-61-00  
E-mail: irekg@rambler.ru



цессе синтеза подвергается дальнейшему созреванию, с образованием неравных  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц; при этом аминокислотные остатки, образующие линкерный пептид, теряются. Семенной лектин *Pisum sativum* (PSL), синтезированный в *E. coli* в виде отдельных цепей, согласно тестам агглютинации эритроцитов, проявлял углеводспецифичность, почти сходную с растительным [8]. Кроме того, Хиггинс с соавт. показали, что лектин, синтезированный в клетках *E. coli* в виде пролектина, одним полипептидом, сохраняет углеводсвязывающие свойства [7]. То есть не возникает проблемы, связанной с расщеплением  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей лектина и их ассоциацией в функциональный белок в гетерологичном окружении.

Цель настоящего исследования — оценить возможность применения синтезированных в экспрессионных прокариотических системах лектинов в экзогенной обработке ими ризобий в ризосфере бобовых для выяснения их значения в расширении хозяйской специфичности растений.

### Материалы и методы

Объектами исследования влияния являлись люцерна посевная (*Medicago sativa*), а также ризобии *Sinorhizobium meliloti* и *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae*, из коллекции ризобий ИБГУНЦ РАН.

Последовательность гена лектина *Pisum sativum* (AN Y00440) взята из международного банка данных GenBank. ДНК из 2-суточных проростков выделяли фенольно-детергентным методом [12]. Полноразмерный ген PSL с хромосомной ДНК амплифицировали праймерами, содержащими сайт рестрикции Bgl II, один из которых приходился на АТГ кодон гена, а другой отжигался чуть ниже кодона терминации. Ампликоны рестрицировали по Bgl II сайту и клонировали по Bam HI сайту экспрессионного вектора pET-15b, предварительно обработав его липкие концы щелочной фосфатазой. При анализе рекомбинантных клонов для определения размера вставки применяли быстрый метод щелочного лизиса бактериальных колоний. Результаты клонирования проверяли секвенированием на автоматическом секвенаторе «ABI PRISM 310 Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, США). Процедуры лигирования ДНК, приготовления компетентных клеток *E. coli* и трансформации рекомбинантной ДНК также проводили по стандартным прописям, изложенным в лабораторном руководстве Сэмбука и соавт. [13].

Для синтеза белка 30 мл питательной среды TY (0,1% дрожжевой экстракт, 1% бакто-триптон, 0,1%

CaCl<sub>2</sub>) засеивали 2 мл ночной культуры штаммов клеток *E. coli*, наращивали при 37 °С до OD<sub>600</sub> = 0,6. Экспрессию гена лектина индуцировали добавлением IPTG до 0,7 мМ и инкубировали в течение 4 ч при 30 °С с интенсивной аэрацией. Бактерии, выросшие до OD<sub>600</sub> = 2,0 центрифугировали и промывали в SE буфере (0,3 М NaCl, 50 мМ Трис-НCl, рН 6,9). Клетки ресуспендировали в 4 мл буфера В (10 мМ имидазол, 0,15 М NaCl, 25 мМ Трис-НCl, рН 6,9) и замораживали при -70 °С. Через 12 ч суспензию клеток фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры SMWP («Millipore», США) с размером пор 5 мкм. Затем аффинной хроматографией на His Tag колонках («Amersham», США) проводили элюцию белка по протоколу фирмы-изготовителя. Диализовали раствор белка против TBS буфера (0,15 М NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 5 мМ MnCl<sub>2</sub>, 10 мМ Трис-НCl, рН 6,9) в течение 12 ч при 4 °С.

Ризобии выращивали на чашках Петри с агаризованной средой TY в течение 2–3 сут при 28 °С. Обработку ризобий лектинами проводили в ризосфере проростков бобовых растений. Для этого в стерильные пробирки вносили по 100 мкл суспензии клубеньковых бактерий в среде TY, OD<sub>600</sub> = 2,0 и добавляли лектин до конечной концентрации 10 мкг/мл. Затем в них помещали стерильные 2–5 сут проростки, погружая корни в раствор. Инкубировали в течение 15 ч при 28 °С, после чего проростки с инокулятом пересаживали в стаканчики со стерилизованным вермикулитом, насыщенным солями раствора Хогланда — Арнона, и выращивали 40 сут.

Бактерии из клубеньков люцерны выделяли следующим образом. Клубеньки стерилизовали в 10% гипохлорите натрия в течение 2–3 мин и промывали 3–4 раза в дистиллированной воде. Затем клубеньки раздавливали в 100 мкл TY среды, суспензию осветляли на вортексе и высевали на чашках Петри с агаризованной средой TY.

### Результаты и обсуждение

**Синтез лектина в штаммах клеток *E. coli* и его выделение.** Как уже было отмечено, в клетках растений пролектин гороха в процессе синтеза подвергается процессингу с удалением пептида 180Pro — 188Val и образованием  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц. Вместе с тем у некоторых представителей рода *Lathyrus*, например, *L. nissolia*, той же трибы *Viciae*, что и *P. sativum*, обнаружен одноцепочечный лектин, аминокислотная последовательность которого очень схожа с последовательностями двухцепочечных лектинов других представителей этого рода. При



обработке его неочищенным экстрактом незрелых семян *L. ohrus* (лектин которого является двухцепочечным) он превращался в двухцепочечную форму [14]. Кроме того, трехмерные структуры одноцепочечных лектинов (конканавалина А, *Griffonia simplicifolia*) и двухцепочечных (*P. sativum*, *Vicia faba*, *Lathyrus ohrus*) обнаруживают удивительное сходство [15, 16]. Интересно было выяснить, проявляет ли функциональную активность лектин гороха в одноцепочечной форме, для чего полноразмерный ген этого белка был клонирован в экспрессионном векторе рЕТ-15b.

Клетки трансформировали кальциевым методом плазмидой рЕТ-15b с геном лектина гороха

посевого. Поиск наиболее оптимального уровня синтеза лектина был проведен среди штаммов клеток *E. coli*: BL21(DE3)рLysS, BL21trxB(DE3)рLysS и OrigamiB(DE3)LysS.

Наработку лектина в клетках оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Довольно высокий уровень наработки белка обнаружен в штамме OrigamiB(DE3)LysS. У штамма BL21trxB(DE3)рLysS отмечен небольшой уровень синтеза целевого белка. В клетках *E. coli* BL21(DE3)рLysS детектировать лектин не удалось, несмотря на разнообразные условия индукции экспрессии гена (рис. 1а).

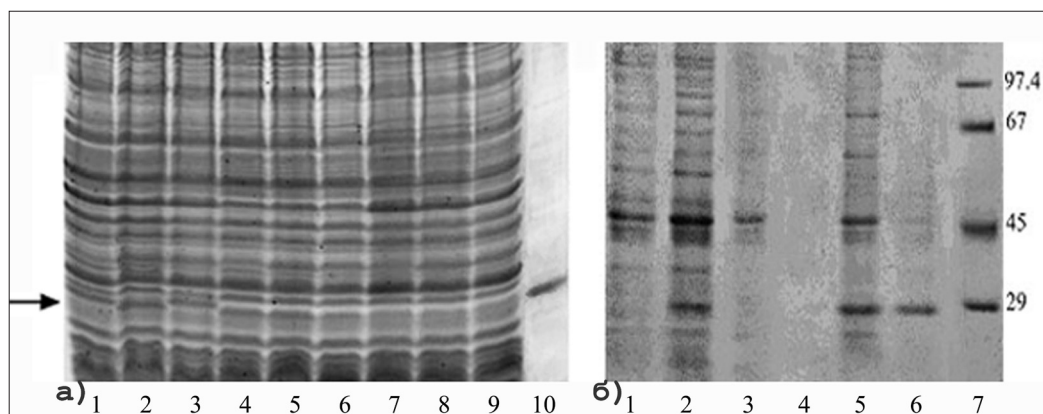


Рис. 1. а) Электрофореграмма препаратов тотального белка (ТБ) штаммов клеток *E. coli* в SDS-ПААГ: 1 – ТБ OrigamiB(DE3)LysS рЕТ-15b; 2 – ТБ OrigamiB(DE3)LysS рЕТ-15bPSL; 3 – ТБ OrigamiB(DE3)LysS; 4 – ТБ BL21trxB(DE3)рLysS рЕТ-15b; 5 – ТБ BL-21trxB(DE3)рLysS рЕТ-15bPSL; 6 – ТБ BL21trxB(DE3)рLysS; 7 – ТБ BL21(DE3)рLysS рЕТ-15b; 8 – ТБ BL21(DE3)рLysS рЕТ-15bPSL; 9 – ТБ BL21(DE3)рLysS; 10 – лектин *Pisum sativum*; Стрелкой показан лектин

б) Электрофореграмма препаратов белка клеток *E. coli*: 1 – ТБ клеток без гена лектина; 2 – ТБ клеток с геном лектина; 3 и 4 – I и II фракция элюции белка из клеток без гена лектина; 5 и 6 – I и II фракция элюции белка из клеток с геном лектина; 7 – маркер молекулярной массы, кДа

Хотя наиболее высокий уровень синтеза лектина обнаружен в штамме OrigamiB(DE3)LysS, в котором образовывалось наименьшее количество нерастворимых белковых агрегатов, наработку белка проводили в BL21trxB(DE3)рLysS, поскольку именно с использованием этого штамма удалось добиться наилучшего выделения лектина аффинной хроматографией. По нашим оценкам, данные штаммы *E. coli* продуцируют приблизительно от 2 до 5 мг лектина на литр культуральной среды в поздней логарифмической фазе роста.

Экспрессионный вектор рЕТ-15b имеет шесть повторов гистидинового кодона САТ, локализованных между его Т7 промотором и сайтом Bam HI, по которому был клонирован ген лектина, что позволяет элюировать его аффинной хроматографией и детектировать как целевой в результате выделения. Как видно на рисунке 1б, белка массой 28 кДа нет в тотальной белковой фракции клеток без гена лектина (дорожка 1) и в элюатах белка из этих клеток (дорожки 3 и 4). Напротив, в рекомбинантных клетках с геном лектина

можно видеть целевой белок (дорожка 2) и в его элюате (дорожки 5 и 6). Таким образом, элюируемый белок не принадлежит клеткам *E. coli*, а является целевым белком, лектином.

**Экзогенная обработка лектином бактерий в ризосфере бобовых растений.** Во многих работах предобработку ризобий исследователи проводили лектином, содержащимся в грубом семенном экстракте. Это обусловлено тем, что индукция ответов клеток осуществляется не только лектином, являющимся одним из компонентов сложного сигналинга двух симбионтов, но и рядом других факторов, секретлируемых растением.

Так, например, Олсон с соавт. [17] сообщили, что в присутствии корневого экстракта сои наблюдался повышенный уровень  $\beta$ -галактозидазы, ген *lacZ* которой был помещен под промоторы генов *Rhizobium fredii*. В то же время экстракты других бобовых подобного эффекта не вызывали. Также у некоторых штаммов *B. japonicum* лектин-связывающие рецепторы в составе липополисахаридов появлялись лишь после инкубации бактерий в экссудатах корней сои [18]. То есть инициация и развитие клубеньков требуют синтеза белка *de novo* в ризобиях и растениях. Минимальная концентрация лектина в опытах, составлявшая приблизительно 10 мкг/мл, должна быть

достаточной для насыщения лектин-связывающих сайтов поверхности клеток ризобий. При данной концентрации обнаруживался индуцирующий эффект лектина [19].

Кроме того, возраст бактерий влияет на эффективность инициации инфицирования — связывание лектина с ризобиальной клеточной поверхностью существенно изменяется с изменением условий культивирования клеток, а также с их возрастом [20]. Возможно, что лектиновые рецепторы на поверхности ризобий транзистентны и их наличие зависит от условий роста и возраста бактерий [18]. Мы попытались преодолеть эти трудности совместной экзогенной обработкой лектинами и растений и бактерий в течение 15 ч, снижая тем самым риск пропустить наиболее благоприятную фазу роста бактерий для индукции их компетентности клубенькообразования.

Было поставлено три контроля. Первый — на спонтанное образование клубеньков и контаминацию. В данном варианте вместо суспензии бактерий в пробирку добавляли стерильную среду ТУ. Второй — на нодуляцию своим штаммом, без обработки лектином. Третий — на нодуляцию гетерологичными штаммами, без лектина. Во все контрольные варианты вместо лектина в пробирки добавляли элюат белковой фракции клеток *E. coli* без гена лектина.

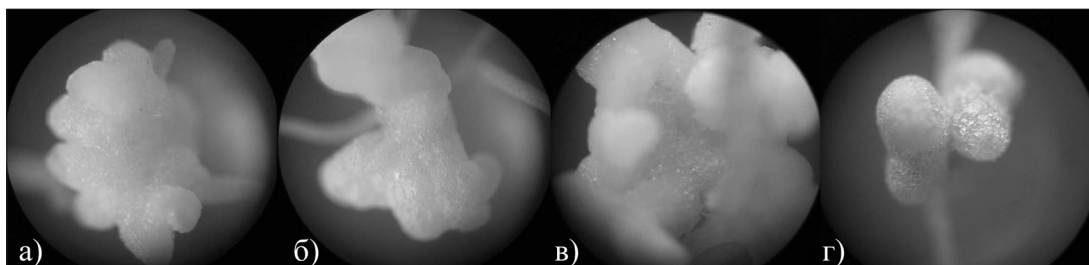


Рис. 2. Клубеньки, сформировавшиеся на корнях люцерны при инокуляции ее: а), б), в) — неспецифическими *R. leguminosarum* *bv. viciae*, обработанными лектином PSL; г) — ризобиями люцерны (*S. meliloti*) — контрольный вариант

**Влияние пролектина PSL на симбиоз *Medicago sativa* с ризобиями.** Некоторые линии люцерны формируют в стерильных условиях псевдоклубеньки, близкие по структуре к нормальным, возникающим при инокуляции растений штаммами *S. meliloti* [21].

В контрольном варианте на спонтанное образование клубеньков и контаминацию без обработки инокулятом и лектином, а также в варианте с инокуляцией растений гетерологичным штаммом без лектина, клубенькообразования замечено не было. При обработке *M. sativa* своими штаммами *S. meliloti* наблюдали нор-

мальную нодуляцию с образованием инфицированных ризобиями клубеньков.

При обработке лектином PSL ризобий *R. leguminosarum* *bv. viciae* в ризосфере люцерны мы обнаружили пустые клубеньки необычайно больших размеров, имевшие особенную гроздевидную форму, не наблюдавшуюся в других вариантах (рис. 2). Известно, что форма клубеньков может меняться, например, у люцерны вместо активных веретеновидных клубеньков формируются неактивные, мелкие шаровидные или, напротив, крупные гроздевидные клубеньки.

Данные нарушения симбиоза вызываются либо растением-хозяином (как это наблюдал Брилл с соавт. на люцерне при интродукции в нее гена ее собственного лектина MsLEC1 в антисенс ориентации [20], что свидетельствует об участии лектина люцерны в инициации клубенькообразования), либо мутациями ризобий [23] и изменениями их симбиотических факторов.

При интродукции гена лектина PSL в *M. sativa* трансформант инокулировался бактериями *R. leguminosarum* *bv. viciae* (симбионт *P. sativum*), содержащими плазмиду с *pod* генами *S. meliloti* с образованием инфекционных нитей и псевдоклубеньков [3]. То есть ответные реакции, наблюдаемые на люцерне при инокуляции ее неспецифичными штаммами *R. leguminosarum* *bv. viciae*, схожи как при экспрессии гена лектина гороха в ее корневых клетках, так и при экзогенной обработке ее лектином гороха.

Подобное расширение лектинами чувствительности растений к гетерологичным ризобиям обнаружено также, например, на трансгенном по гену лектина PSL красном клевере. Клевер не только становился отзывчивым на ризобии *R. leguminosarum* *bv. viciae*, но, более того, формировал псевдоклубеньки при инокуляции его *Mesorhizobium loti* и *S. meliloti* [4].

### Заключение

Таким образом, лектин *P. sativum*, синтезированный в штаммах *E. coli*, сохранял не только свою углеводспецифичность, почти идентичную выделенному из семян этого растения [9], но и, как было показано нами, сохраняет, будучи одноцепочечным полипептидом, также некоторые свои физиологические свойства, вызывающие специфические реакции клубенькообразования при экзогенной обработке им клубеньковых бактерий в ризосфере люцерны. Данные результаты свидетельствуют о возможности выяснения синтезированными в прокариотических системах лектинами их функциональной значимости в тех или иных симбиотических системах путем экзогенной обработки, что может значительно облегчить исследования их роли, не прибегая к трудоемкой процедуре трансформации растений.

Работа получила финансирование по программе «Государственная поддержка ведущих научных школ России» (НШ-2217.2003.4 и НШ-1003.2006.4), Российского фонда фундаментальных исследований (04-04-48884) и РФФИ-Агидель (02-04-97903).

### Литература

1. Diaz C.L., Logman T.J.J., Stam H.C., Kijne J.W. Sugar-Binding activity of pea lectin expressed in white clover hairy roots // *Plant Physiol.* — 1995. — Vol. 109. — P. 1167–1177.
2. van Eijsden R.R., Diaz C.L., de Pater B.S., Kijne Y.W. Sugar-binding activity of pea (*Pisum sativum*) lectin is essential for heterologous infection of transgenic white clover hairy roots by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* // *Plant. Mol. Biol.* — 1995. — Vol. 29. — P. 431–439.
3. van Rhijn P., Fujishige N.A., Lim P.O., Hirsh A.M. Sugar-binding activity of pea lectin enhances heterologous infection of transgenic alfalfa plants by *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* // *Plant Physiology.* — 2001. — Vol. 126. — P. 133–134.
4. Diaz C. L., Spaink H.P., Kijne J.W. Heterologous rhizobal lipochitin oligosaccharides and chitin oligomers induce cortical cell divisions in red clover root, transformed with the pea lectin gene // *Mol. Plant Microbe Interact.* — 2000. — Vol. 13. — P. 268–276.
5. van Rhijn P., Goldberg R.B., Hirsch A.M. Lotus corniculatus nodulation specificity is changed by presence of a soybean lectin gene // *Plant Cell.* — 1998. — V. 10. — P. 1233–1250.
6. He X.G. Signal molecules of plant-induced of gene expression of bacteria // *Acta Bot. Sin.* — 1990. — Vol. 32. — P. 896–900.
7. Higgins T.J.V., Chandler P.M., Zurawski G., Button S.C., Spencer D. The biosynthesis and primary structure of pea seed lectin // *J. Biol. Chem.* — 1983. — Vol. 258. — P. 9544–9549.
8. Stubbs M.E., Carver J.P., Dunn R.J. Production of lectin in *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* — 1986. — Vol. 261. — P. 6141–6144.
9. Longstaff M., Powell K.S., Gatehouse J.A. Production and purification of active snowdrop lectin in *Escherichia coli* // *Eur. J. Biochem.* — 1998. — Vol. 252. — P. 59–65.
10. Jordan E.T., Goldstein I.J. The sequence of second member of the Lima Bean lectin gene family and the expression and characterization of recombinant lectin in *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* — 1993. — Vol. 269. — P. 7674–7681.
11. Elgavish S., Shaanan B. Chemical characteristics of dimmer interfaces in the legume lectin family // *Protein Science.* — 2001. — Vol. 10. — P. 753–761.
12. Graham D.E. The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses // *Anal. Biochem.* — 1978. — Vol. 85. — P. 609–613.
13. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Second ed. — Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. — 1682 p.
14. Rouge P., Pere D., Bourne Y. Single- and two-chain legume lectins: a revisited question / *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, 1990. — P. 105–112.

15. Rouge P., Cambillau C., Bourne Y. The three-dimensional structure of legume lectins / *Lectin Reviews*. — St. Louis, Sigma Chem. Comp., 1991. — Vol. 1. — P. 143–159.
16. Sharon N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view // *Trends Biochem. Sci.* — 1993. — Vol. 18. — P. 221–226.
17. Olson E.R., Sadowsky M.J., Verma D.P.S. Identification of genes involved in the Rhizobium-legume symbiosis by Mu-di (Kan, Lac)-generated transcription fusions // *Biotechnology*. — 1985. — Vol. 3. — P. 143–149.
18. Bhuvanewari T.V., Bauer W.D. Role of lectins in plant-microorganism interactions // *Plant Physiol.* — 1978. — Vol. 62. — P. 71–74.
19. Lodeiro A.R., Lopez-Garcia S.L., Vazquez T.E.E., Favelukes G. Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of Bradyrhizobium japonicum by its pretreatment with soybean seed lectin // *FEMS Microbiol. Lett.* — 2000. — Vol. 188. — P. 177–184.
20. Bhuvanewari T.V., Mills K.K., Crist D.K., Evans W.R., Bauer W.D. Effect of culture age on symbiotic infectivity of Bradyrhizobium japonicum // *J. Bacteriol.* — 1983. — Vol. 153. — P. 443–451.
21. Joshi P.A., Caetano-Anolles G., Graham E.T., Gresshoff P.M. Ontogeny and ultrastructure of spontaneous nodules in alfalfa (Medicago sativa) // *Protoplasma*. — 1991. — Vol. 162. — P. 1–11.
22. Brill L.M., Fujishige N.A., Hackworth C.A., Hirsch A.M. Expression of MsLEC1 transgenes in alfalfa plants causes symbiotic abnormalities // *Mol. Plant Microbe Interact.* — 2004. — Vol. 17. — P. 16–26.
23. Федоров С.Н., Симаров Б.В. Получение мутантов с измененными симбиотическими свойствами у Rhizobium meliloti под действием УФ-лучей // *С.-х. биология*. — 1987. — Т. 9. — С. 44–49.

## THE SYNTHESIZED IN E. COLI PEA LECTIN IS CAPABLE TO INITIATE A NODULATION OF ALFALFA PRETREATED BY R. LEGUMINOSARUM BV. VICIAE

I.I. GUBAYDULLIN, Al.Kh. BAYMIEV, An.Kh. BAYMIEV, A.V. CHEMERIS, V.A. VAKHITOV

*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center of Russian Academy of Sciences*

The full-size *Pisum sativum* lectin gene was cloned. The pea lectin, synthesized as a single polypeptide chain unclesaved prolectin in *E. coli* has shown functionality; under pre-treatment by this lectin *Rhizobium leguminosarum bv. viciae* we have found giant noninfection multilobed nodules not observed in control variants in roots of alfalfa. Thereby, this prolectin produced in the expression prokaryotic system saves not only sugar binding properties, as well as also some their own physiological characteristics, causing specific nodulation reactions.

*Keywords:* legume-rhizobial symbiosis, lectins, *Pisum sativum*.



# АТР-ЗАВИСИМЫЙ ТРАНСПОРТ СУКЦИНАТА В ВЕЗИКУЛЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

В.В. ПЕТРОВ\*

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
Пушино Московской обл.*

Сукцинат — один из ценных метаболитов, накапливающихся в среде роста дрожжей. С помощью флуоресцентных методов и радиоизотопного анализа изучали поглощение сукцината везикулами плазматических мембран *Saccharomyces cerevisiae*. Обнаружена система поглощения сукцината в везикулы, соответствующая системе его выброса *in vivo*, осуществляемого через переносчик для сукцината, при транспорте которого используется энергия электрохимического градиента протонов.

*Ключевые слова:* плазмалемма, транспорт,  $\Delta\mu_{H^+}$ , АТРаза, сукцинат, дрожжи, везикулы.

Сукцинат — один из продуктов центрального метаболизма клеток, который при определенных условиях (например, при недостатке азота) может в значительном количестве экскретироваться дрожжами в культуральную жидкость [1]. На способности ряда микроорганизмов накапливать внеклеточный сукцинат основаны микробиологические методы получения этого ценного метаболита, используемого при производстве лекарств, продуктов, красителей, детергентов [1, 2]. Вместе с тем механизм его экскреции у дрожжей до сих пор не изучен, а сведения о механизме выхода из клеток дрожжей других органических кислот противоречивы, несмотря на то, что этот процесс начал изучаться давно [3, 4]. В частности, имеется указание на наличие активного выброса малата у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [5], в то время как показано, что АТРаза плазмалеммы не участвует в экскреции цитрата из клеток *Yarrowia lipolytica* [6]. Приведенные выше данные были получены в условиях *in vivo*, что не позволяло детально разграничить различные транспортные процессы, происходящие в дрожжевой клетке, затрудняя тем самым интерпретацию результатов.

Поэтому целью данной работы являлась характеристика транспорта сукцината в условиях *in vitro* с

использованием модельной системы, представлявшей собой инвертированные везикулы плазматических мембран дрожжей *S. cerevisiae*. Ранее нами был разработан метод выделения таких везикул, обладавших низкой неспецифичной ионной проницаемостью и удерживающих протонный градиент длительное время, что делало их пригодными для проведения транспортных исследований [7].  $H^+$ -АТРаза таких инвертированных везикул, являющаяся первичной транспортной системой, была ориентирована наружу, при этом создавая и поддерживая на них электрическую ( $E_m$ ) и химическую ( $\Delta pH$ ) составляющие электрохимического градиента протонов ( $\Delta\mu_{H^+}$ ), направленные внутрь везикул. Известно [8, 9], что работа вторичных транспортных систем обеспечивается за счет энергии  $\Delta\mu_{H^+}$ ; поэтому такие везикулы можно использовать для выяснения механизма экскреции сукцината. В наших экспериментах внутреннее пространство таких везикул моделировало культуральную жидкость. Таким образом, транспорт сукцината внутрь везикул соответствовал экскреции этого метаболита из дрожжевой клетки в ситуации *in vivo*.

## Материалы и методы

Выращивание дрожжей *S. cerevisiae*, выделение сферопластов и получение из них везикул плазматических мембран проводили, как описано [7, 10, 11]. Определение белка осуществляли модифицированным методом Лоури [12]. Измерение активности АТРаза везикул (в присутствии 250 мМ сахарозы) и листов (везикул в отсутствие сахарозы, то есть подвергнутых осмотическому шоку)

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Петров Валерий Валериевич,  
канд. биол. наук, научный сотрудник Института биохимии  
и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН  
142290 Пушино Московской обл.  
Тел.: (496) 773-0815  
Факс: (495) 956-3370  
E-mail: vpetrov06@mail.ru



плазматических мембран проводили по высвобождению ортофосфата при ферментативном гидролизе 1 мМ Mg-АТР (1 мМ MgSO<sub>4</sub> + 1 мМ Na<sub>2</sub>АТР) [7, 10, 11]. Генерируемые АТРазой ΔрН и мембранный потенциал регистрировали с помощью флуоресцентных красителей 9-амино-6-хлоро-2-метоксиакридина (АСМА) и бис(3-фенил-5-оксоизоксазол-4-ил)пентаметин оксонола (оксонол V), соответственно, на спектрофлуориметре М850 (Hitachi, Япония), используя при определении ΔрН длины волн возбуждения и эмиссии 415 и 485 нм, соответственно, и 609 и 640 нм — при определении E<sub>m</sub>, как описано ранее [7, 10, 11].

В опытах по поглощению сукцината к 1 мл раствора, содержащего 0,25 мМ сахарозу, 10 мМ MES-NaOH, 1 мМ Na<sub>2</sub>АТР, 1 мМ MgSO<sub>4</sub>, рН 6,5, добавляли везикулы и инкубировали при 30 °С 1–3 мин. Затем туда же вносили раствор [<sup>14</sup>С]сукцината, доведенный NaOH до рН инкубационной среды. Вновь инкубировали в течение 0,5–5 мин., после чего разводили в 10 раз холодным раствором 0,25 мМ сахарозы в 10 мМ MES-NaOH, рН 6,5 и отфильтровывали везикулы через предварительно смоченные тем же буфером стекловолоконистые фильтры GF/F (Whatman, Великобритания) в установке для фильтрования (Millipore, США) при давлении 20–30 см рт. столба. Фильтры с везикулами дважды промывали 10 мл холодного раствора 0,25 мМ сахарозы в 10 мМ MES-NaOH, рН 6,5, после чего их сушили. Радиоактивность [<sup>14</sup>С]сукцината на фильтрах (в импульсах в секунду) измеряли на счетчике фирмы «Intertechnique» (Франция).

### Результаты и их обсуждение

В экспериментах по изучению транспорта сукцината с помощью флуоресцентных методов было показано, что при добавлении 1 мМ Mg-АТР к везикулам наблюдается гашение флуоресценции АСМА (рис. 1) и оксонола V (рис. 2). Это свидетельствовало об образовании на мембране ΔрН (кислый внутри) и E<sub>m</sub> (положительный заряд внутри), соответственно. Натриевые соли сукцината, нитрата и сульфата добавляли или до Mg-АТР, когда Δμ<sub>H<sup>+</sup></sub> еще был не создан, или после внесения субстрата АТРазы, когда оба компонента Δμ<sub>H<sup>+</sup></sub>, ΔрН и E<sub>m</sub>, были сформированы.

Использованные анионы обладали различным действием на формирование Δμ<sub>H<sup>+</sup></sub>. Нитрат, являющийся проникающим анионом, стимулировал формирование ΔрН (рис. 1) и практически полностью разрушал E<sub>m</sub> (рис. 2). В отличие от него сукцинат вызывал уменьше-

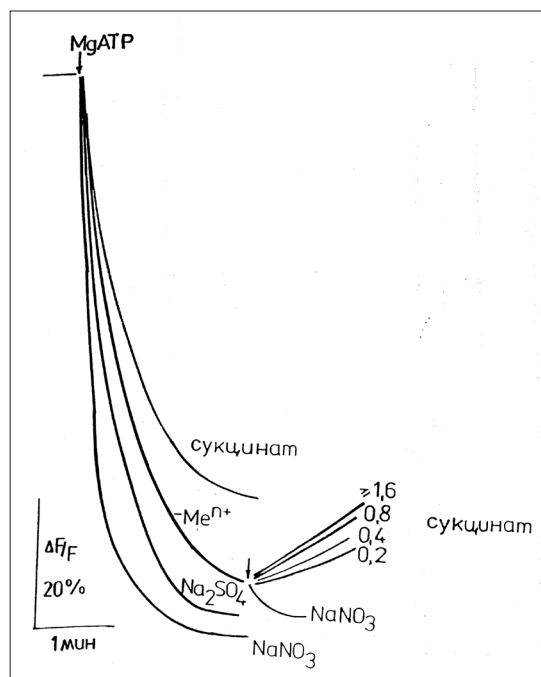


Рис. 1. Действие сукцината, нитрата и сульфата натрия на АТР-зависимое образование ΔрН на плазмалемме *S. cerevisiae*. Масштаб флуоресценции (ΔF/F) указан в процентах. Добавлены до Mg-АТР (указана конечная концентрация): 10 мМ NaNO<sub>3</sub>; 10 мМ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,2 мМ сукцинат натрия. Стрелками указано внесение (до конечной концентрации) 1 мМ Mg-АТР, 1 мМ NaNO<sub>3</sub> и сукцината (цифрами обозначена его концентрация в мМ)

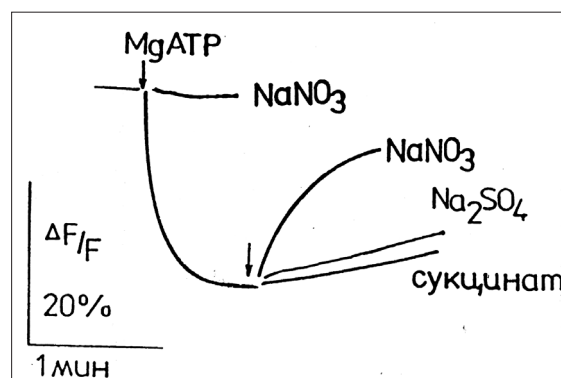


Рис. 2. Действие сукцината, нитрата и сульфата натрия на АТР-зависимое образование E<sub>m</sub> на плазмалемме *S. cerevisiae*. Масштаб флуоресценции (ΔF/F) указан в процентах. Добавлен до Mg-АТР: 2 мМ NaNO<sub>3</sub>. Стрелками указано внесение (до конечной концентрации) 1 мМ Mg-АТР, 2 мМ NaNO<sub>3</sub>, 10 мМ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и 2 мМ сукцината

ние  $\Delta pH$ , если был добавлен до MgATP, или разрушение  $\Delta pH$ , если протонный градиент уже был сформирован (рис. 1), причем процесс разрушения характеризовался кинетикой насыщения (см. ниже). Сукцинат разрушал одновременно и  $E_m$ , что указывает на его проникновение внутрь везикул в форме аниона (рис. 2). Сульфат натрия, являющийся непроникающим анионом и используемый как контроль, не только не уменьшал  $\Delta pH$ , но даже увеличивал его (рис. 1), в то же время разрушая  $E_m$  (рис. 2). Однако разрушение  $\Delta \mu_{H^+}$  не характеризовалось кинетикой насыщения, а действие сульфата проявлялось при значительно более высоких концентрациях, чем в случае сукцината. В концентрациях, вызывающих эффективное разрушение  $\Delta \mu_{H^+}$ , сукцинат не влиял на ATPазную активность листов плазматических мембран и увеличивал ее в случае везикул, когда ATPаза находится под протонным контролем (табл. 1). Подобным же образом, за счет частичного снятия протонного контроля, на ATPазную активность везикул действовал и сульфат (табл. 1). Очевидно, уменьшение сукцинатом  $\Delta pH$  и  $E_m$  не может быть вызвано торможением им  $H^+$ -ATPазы.

Таблица 1

**Влияние сукцината и сульфата натрия на активность ATPазы везикул и листов плазматических мембран (в %)**

Анион	Везикулы	Листы
Контроль <sup>1</sup>	100 <sup>2</sup>	100 <sup>3</sup>
Сульфат, 10 мМ	140	111
Сукцинат, 2 мМ	105	92
Сукцинат, 10 мМ	135	110

<sup>1</sup> – 10 мМ MES-NaOH, 1 мМ MgSO<sub>4</sub>, 1 мМ Na<sub>2</sub>ATP (листья) + 250 мМ сахароза (везикулы), pH 6,5;

<sup>2</sup> – 0,7 мкмоль Pi/мин на 1 мг белка;

<sup>3</sup> – 1,3 мкмоль Pi/мин на 1 мг белка

Полученные факты могут быть объяснены следующим образом. При работе  $H^+$ -ATPазы, накачивающей внутрь инвертированных везикул ионы  $H^+$ , pH в них понижается до 3,5 [5], в то время как константы диссоциации янтарной кислоты равны 4,21 и 5,63 (при 25 °C). Поэтому внутри везикул сукцинат связывается с  $H^+$  в слабодиссоциируемую форму, что и объясняет уменьшение  $\Delta \mu_{H^+}$ , в отличие от нитрата, при поступлении которого внутрь везикул происходит перераспределение энергии между химической (увеличение) и электрической (уменьшение) составляющими  $\Delta \mu_{H^+}$  (рис. 1, 2).

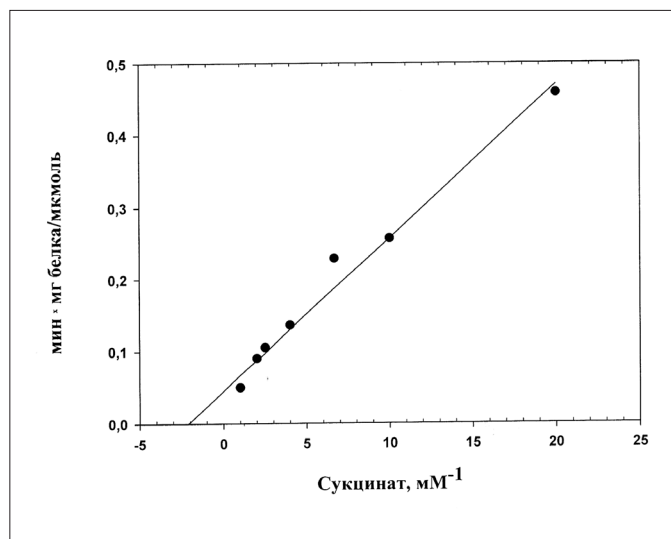


Рис. 3. График Лайнуивера – Берка для ATP-зависимого поглощения [<sup>14</sup>C]сукцината в везикулы плазматических мембран дрожжей *S. cerevisiae*

Процессы уменьшения и разрушения протонного градиента характеризуются кинетикой насыщения.  $K_{1/2}$  разрушения  $\Delta pH$  сукцинатом равна 0,54 мМ и близка к  $K_{1/2}$  уменьшения  $\Delta pH$  при внесении сукцината до MgATP (0,40 мМ). Это указывает на то, что в плазматической мембране дрожжей *S. cerevisiae* имеется переносчик, через который осуществляется транспорт (выброс) сукцината из клетки.

В дальнейших экспериментах функционирование системы активного транспорта сукцината было подтверждено с помощью радиоизотопного анализа. Было показано, что везикулы плазматических мембран могли поглощать меченый [<sup>14</sup>C]сукцинат в присутствии Mg-ATP; причем кинетика накопления и в этом случае подчинялась уравнению Михаэлиса – Ментен. На рисунке 3 в координатах Лайнуивера – Берка представлен транспорт [<sup>14</sup>C]сукцината в везикулы в зависимости от его концентрации, наблюдаемый в присутствии MgATP.  $K_m$  поглощения сукцината составила 0,47 мМ и была близка к величинам, полученным в опытах по влиянию сукцината на формирование  $\Delta \mu_{H^+}$ .

Таким образом, данные, полученные двумя независимыми методами, свидетельствуют о наличии в плазматической мембране дрожжей *S. cerevisiae* переносчика сукцината, который осуществляет выброс данного метаболита из клеток дрожжей в культуральную среду, а сам процесс происходит с использованием энергии  $\Delta \mu_{H^+}$ . Этот вывод согласуется с данными по экскреции другого метаболита – малата, которая зависела от энергизации плазматической мембраны у дрожжей *S. cerevisiae* [5], что дает основание предполагать, что выброс других

анионов дикарбоновых кислот также осуществляется энергозависимо с участием переносчиков для этих анионов.

Изучение систем выхода органических анионов, продуктов метаболизма дрожжевой клетки, представляет дополнительный интерес в связи с предполагаемой возможностью запасания части энергии, высвобождающейся при окислении глюкозы, в форме градиента соответствующей кислоты. Такое предположение заслуживает внимания в связи с работами на бактериях, в которых было показано, что при окислении глюкозы энергия генерируется не только в виде АТФ и  $\Delta\mu_{H^+}$ , но и в виде электрохимического градиента метаболитов, образующегося за счет выброса лактата [13]. Не исключено, что в дрожжевой клетке энергия  $\Delta\mu_{H^+}$  дополняется и частично заменяется на энергию электрохимического градиента метаболитов в условиях их избыточного образования в клетке.

*Автор благодарит Т.В. Кулаковскую и И.С. Кулаева за обсуждение результатов.*

*Работа поддержана грантом РФФИ НШ-4318.2006.4.*

## Литература

1. Zeikus J.G., Jain M.K., Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 1999. — Vol. 51. — P. 545–552.
2. Кондрашова М.Н. Гормоноподобное действие янтарной кислоты // *Вопр. биол. мед. фарм. химии.* — 2002. — № 1. — С. 7–12.
3. Rothstein A., Enns L.H. The relationship of potassium to carbohydrate metabolism in baker's yeast // *J. Cell Comp. Physiol.* — 1946. — Vol. 28. — P. 231–252.
4. Conway E.J., Brady T.G. Biological production of acids and alkali // *Biochem. J.* — 1950. — Vol. 47. — P. 360–369.
5. Salmon J.M. L-malic-acid permeation in resting cells of anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1987. — Vol. 901. — P. 30–34.
6. Кулаковская Т.В., Матяшова Р.Н., Петров В.В., Куранова Е.В. АТФаза плазматической мембраны не участвует в процессе выхода лимонной кислоты из клеток дрожжей *Yarrowia lipolytica* // *Микробиология.* — 1994. — Т. 63. — С. 23–28.
7. Окорок Л.А., Петров В.В. Выделение везикул плазматических мембран дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis*, пригодных для исследования транспорта веществ // *Биол. мембраны.* — 1986. — № 3. — С. 549–556.
8. Goffeau A., Slayman C.W. The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1981. — Vol. 639. — P. 197–221.
9. Serrano R. Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump // *Cur. Top. Cell. Regul.* — 1984. — Vol. 23. — P. 87–126.
10. Petrov V.V., Okorokov L.A. Increase of the anion and proton permeability of *Saccharomyces carlsbergensis* plasmalemma by n-alcohols as a possible cause of its deenergization // *Yeast.* — 1990. — Vol. 6. — P. 311–318.
11. Petrov V.V., Smirnova V.V., Okorokov L.A. Mercaptoethanol and dithiothreitol decrease the electrochemical potential gradient of protons across the yeast plasma and vacuolar membranes and activate their ATPases // *Yeast.* — 1992. — Vol. 8. — P. 589–598.
12. Markwell M.A.K., Haas S.M., Bieber L.L., Tolbert N.E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples // *Anal. Biochem.* — 1978. — Vol. 87. — P. 206–210.
13. Konings W.N. Generation of metabolic energy by end-product efflux // *TIBS.* — 1985. — Vol. 10. — P. 317–319.

## АТФ-DEPENDENT TRANSPORT OF SUCCINATE INTO PLASMATIC MEMBRANE VESICLES OF YEAST SACCHAROMYCES CEREVISIAE

V.V. PETROV

*G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS, Puschino Moscow Region*

Succinate is one of the valuable metabolites accumulating in the yeast growth medium. Succinate uptake into plasma membrane vesicles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was studied by means of fluorescence methods and radioactive isotope analysis. A system for succinate influx was found in vesicles, which corresponds to its efflux system in vivo. Succinate transport is supported by the energy of the electrochemical proton gradient and occurs via succinate carrier.

*Keywords:* plasmalemma, transport,  $\Delta\mu_{H^+}$ , ATPase, succinate, yeast, vesicles.

## ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ HLA II КЛАССА У ПАЦИЕНТОВ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПАРОДОНТА

Е.Н. НИКОЛАЕВА, В.Н. ЦАРЕВ, Е.А. ГОРБАЧЕВА, Е.В. ИППОЛИТОВ\*, Т.Н. ЦАРЕВА

*Научно-исследовательский институт и кафедра микробиологии  
Московского государственного медико-стоматологического университета*

Установлены характерные для представителей смешанной популяции г. Москвы, чувствительных и резистентных к пародонтиту, особенности аллельного полиморфизма генов HLA II класса. Каждому из генов HLA-DRB1, -DQA1 и -DQB1 присущ широкий спектр аллельного полиморфизма. Выявлено 13 различных специфичностей гена DRB1, 8 аллелей гена DQA1 и 12 аллелей гена DQB1. Характер распределения специфичностей аллелей генов HLA II класса у мужчин и женщин указанной популяции в целом соответствует аналогичным данным для лиц европеоидной расы, описанным в литературе. Показаны слабые положительные ассоциации специфичности гена DRB1 \*04 и аллеля DQA1 \*0301 ( $RR > 2$ ,  $p < 0,05$ ), а также отрицательные ассоциации DRB1 \*01 и DQA1 \*0101 ( $p < 0,05$ ) у женщин с хроническим генерализованным пародонтитом. Обнаружены отрицательные ассоциации DRB1 \*01 и DQA1 \*0101 ( $p < 0,05$ ) в группе мужчин с агрессивным и хроническим генерализованным пародонтитом, а также тенденция к положительным ассоциациям специфичности гена DRB1 \*04 и аллеля DQA1 \*0301 ( $RR > 2$ ,  $p < 0,05$ ,  $p > 0,05$ ) с пародонтитом у мужчин.

*Ключевые слова:* пародонтит, гены HLA II класса, аллельный полиморфизм.

Несмотря на значительное количество исследований, посвященных изучению особенностей диагностики и лечения генерализованного пародонтита, некоторые вопросы этиопатогенеза данного заболевания окончательно не выяснены. В частности, недостаточно изучены наследственные аспекты его возникновения и развития.

Генетическая предрасположенность к возникновению той или иной патологии реализуется под действием окружающей среды. А сама предрасположенность или резистентность организма к различным заболеваниям определяется антигенным составом его клеток и тканей, в частности, системой HLA [5]. В последние годы большой интерес вызывает исследование связей между различными формами пародонтита и антигенами (генами) главного комплекса гистосовместимости человека (HLA). В ряде исследований были выявлены как позитивные, так и негативные ассоциации некоторых маркеров HLA I и II класса с пародонтитом [6, 7,

20, 21]. Различия в распространении и степени потери зубодесневого прикрепления у мужчин и женщин определенного этнического и расового происхождения дали основания полагать, что зависящие от пола особенности состава и частоты аллелей HLA могут играть роль в индивидуальной предрасположенности к пародонтиту. К настоящему времени известны единичные исследования ассоциаций HLA с пародонтитом отдельно у мужчин и женщин [9].

Целью данной работы являлось изучение с помощью высокоразрешающего метода ДНК-типирования особенностей аллельного полиморфизма генов HLA II класса (DRB1, DQA1, DQB1) у лиц мужского и женского пола, больных генерализованным пародонтитом и в группе здорового населения г. Москвы.

### Материалы и методы

Обследован 171 человек в возрасте от 18 до 65 лет, представляющих смешанную группу населения г. Москвы. Группы для исследования формировали согласно следующим критериям: 1) отсутствие у обследованных лиц онкологических, гематологических, аутоиммунных и других видов патологии, ассоциированных с HLA-генами, 2) европеоидное происхождение для исключения влияния этнического фактора на

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Ипполитов Евгений Валерьевич,  
Московский государственный медико-стоматологический университет  
104473 Москва, ул. Делегатская, 20/1  
E-mail: ipro@bk.ru



распределение полиморфных признаков [1]. Первую группу составили 48 пациентов в возрасте до 35 лет с устойчивым, не поддающимся лечению хроническим генерализованным пародонтитом тяжелой степени. Во вторую группу было включено 69 пациентов старше 38 лет с хроническим генерализованным пародонтитом тяжелой степени. В контрольную группу были отнесены 54 здоровых человека в возрасте от 20 до 64 лет без видимых заболеваний пародонта.

При объективном обследовании обращали внимание на состояние слизистой оболочки рта, десны, зубных рядов. Определяли характер прикуса, наличие зубных отложений, наличие и глубину пародонтального кармана, обнажение корней зубов, их чувствительность и подвижность.

Оценку состояния тканей пародонта проводили, используя упрощенный гигиенический индекс УИГ - ОНI-S (Green J.C., Vermilion J.R., 1960); индекс кровоточивости десневой борозды ИК - SBI (Muehleman H.R., Son S., 1971); пародонтальный индекс ПИ - PI (Russel A., 1956). Глубину пародонтального кармана измеряли с помощью градуированного пуговчатого пародонтального зонда. Для уточнения клинического анализа всем больным назначали рентгенологическое исследование [7].

Для типирования генов HLA класса II (DRB1, DQA1, DQB1) применяли наборы реактивов HLA-ДНК-Тех (фирма «НПФ ДНК-технология», Россия), позволяющие выявлять 13 специфичностей гена HLA - DRB1, 8 аллелей гена HLA - DQA1 и 12 аллелей гена HLA - DQB1. В качестве исследуемого материала использовали эпителиальные клетки со слизистой щеки. Геномную ДНК выделяли из соскобов по описанному в [6] методу Higuchi R. H. и Erlich H. (1989) с некоторыми модификациями. Реакцию амплификации проводили в амплификаторе «Терцик МС2» (фирма «НПФ ДНК-технология») по программам, рекомендованным производителем набора. Детекцию продуктов амплификации проводили в ультрафиолетовом свете после электрофореза в 3%-ном агарозном геле.

Достоверность различий в частоте встречаемости аллелей генов HLA рассчитывали с помощью точного двустороннего критерия Фишера для четырехпольных таблиц с поправкой на количество выявленных аллелей (pc) по методу Бонферони [8]. Наличие HLA-ассоциаций оценивали по величине относительного риска (RR) с расчетом для него 95%-ного доверительного интервала (CI).

## Результаты и обсуждение

Во всех обследованных группах женщин было больше, чем мужчин. В 1-ю группу пациентов вошли 48 человек (21 мужчина и 27 женщин, соотношение 1:1,29) со следующими клиническими признаками агрессивных форм пародонтита: возраст больного до 35 лет, наличие 8 или более зубов с потерей зубодесневого прикрепления  $\geq 4$  мм; по крайней мере, 3 пораженных зуба, не относящихся к молярам и резцам; на рентгенограммах вертикальная и горизонтальная резорбция кости; кровоточивость при зондировании [2, 7]. У 69 человек 2-й группы (28 мужчин и 41 женщина, соотношение 1:1,46) диагноз хронического генерализованного пародонтита был поставлен на основании следующих критериев: возраст свыше 38 лет; сохранено, по крайней мере, 10 зубов; наличие 5 или более зубов с потерей зубодесневого прикрепления  $\geq 4$  мм; детекция потери альвеолярной кости на рентгенограммах; кровоточивость при зондировании; увеличенная подвижность некоторых зубов; высокий индекс налета. У 34 (71%) пациентов 1-й группы и 41 (60%) пациента 2-й группы отмечены сопутствующие заболевания желудочно-кишечного тракта. В контрольную группу вошли 54 человека (22 мужчины и 32 женщины, соотношение 1:1,45) старше 40 лет без признаков гингивита, клинических и рентгенологических показателей потери зубодесневого соединения. Обследованные группы больных статистически достоверно различались по возрасту (табл. 1). Индексные оценки клинических показателей у пациентов 1-й группы незначительно превышали средние показатели пациентов 2-й группы, и только средние значения индекса кровоточивости десневой борозды у пациентов 1-й группы были статистически достоверно выше, чем у пациентов 2-й группы. При этом все эти показатели у пациентов с пародонтитом статистически достоверно отличались от показателей у представителей контрольной группы. Средние показатели УИГ - ОНI-S и ПИ - PI у мужчин и женщин во всех группах сравнения были одинаковыми. Однако средние значения индекса кровоточивости десневой борозды ИК - SBI и пародонтального индекса были статистически достоверно выше у женщин обеих групп, чем у мужчин (табл. 2).

В результате проведенных исследований полиморфизма генов HLA II класса нами выявлены характерные для представителей смешанной популяции г. Москвы, чувствительных и резистентных к пародонтиту, особенности аллельного полиморфизма генов HLA II класса.



Таблица 1

**Демографические показатели обследованных пациентов**

Группа	Обследовано лиц			Возраст, лет		
	Всего	Женщин	Мужчин	Средний	Минимальный	Максимальный
Первая	48	27	21	29,3	22	34
Вторая	69	41	28	48,7	38	58
Контрольная	54	32	22	40,8	20	58
Всего:	171	102	69	44,2	20	60

Таблица 2

**Результаты индексной оценки пациентов с генерализованным пародонтитом и у лиц контрольной группы**

Показатель	Группа		
	1	2	Контрольная
УИГ (ОHI-S)	4,23 ± 0,30*	3,87 ± 0,30*	1,50 ± 0,20
мужчины	4,04 ± 0,24	3,94 ± 0,24	1,64 ± 0,22
женщины	4,42 ± 0,21	3,80 ± 0,21	1,36 ± 0,18
ПИ (PI)	6,04 ± 0,62*	5,68 ± 1,10*	0,41 ± 0,20
мужчины	5,68 ± 0,30	5,23 ± 0,96	0,37 ± 0,24
женщины	6,40 ± 0,66	6,13 ± 1,24	0,45 ± 0,21*
ИК (SBI)	87,00 ± 3,30*	81,16 ± 2,30*	13,00 ± 1,20
мужчины	81,04 ± 3,02	76,84 ± 2,56	11,36 ± 0,24
женщины	93,12 ± 3,44**	85,48 ± 2,04**	14,64 ± 0,21**
ПК (PD)	7,22 ± 0,34*	6,80 ± 0,19*	1,20 ± 0,30
мужчины	6,66 ± 0,28	6,14 ± 0,24	0,96 ± 0,24
женщины	7,56 ± 0,40**	7,46 ± 0,21**	1,44 ± 0,46

Примечание: \* статистически достоверные отличия от контроля,

\*\* статистически достоверные отличия показателей у мужчин и женщин,  $p < 0,05$

Каждому из генов HLA-DRB1, -DQA1 и -DQB1 присущ широкий спектр аллельного полиморфизма; выявлено 13 различных специфичностей гена DRB1, 8 аллелей гена DQA1 и 12 аллелей гена DQB1.

Для каждого из выявленных аллелей и гаплотипов было определено значение относительного риска (RR) — величины, показывающей во сколько раз у индивидуума, несущего данный генетический маркер, выше вероятность заболевания по сравнению с теми, у кого данный маркер отсутствует. Все генетические маркеры с  $RR > 1$  условно называют «протективными»,  $1 < RR < 2$  — «нейтральными», а аллели или гаплотипы, имеющие  $RR > 2$  — «маркерами предрасположенности».

Установлено, что у пациентов с пародонтитом наблюдалось снижение частоты специфичности DRB1 \*01 и аллеля DQA1 \*0101 ( $p < 0,05$ ), как в целом, так и в группах с различным течением заболевания. По-

видимому, эти специфичности можно отнести к протективным. У пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом (2-я группа) наблюдалось увеличение частоты специфичности DRB1 \*04 и аллеля DQA1 \*0301 ( $p < 0,05$ ). Выявлены положительные ассоциации данной формы пародонтита с этими аллелями ( $RR > 2$ ). За счет высокой частоты встречаемости этих аллелей у пациентов 2-й группы наблюдалась тенденция к увеличению этих показателей и в целом у обследованных нами людей с пародонтитом. Отмечена тенденция к росту частоты специфичности DRB1\*07 ( $p = 0,05$ ) и DQA1 \*0103 ( $p = 0,02$ ) у пациентов с агрессивной формой течения пародонтита (1-й группы), аллеля DQB1 \*0302 как в целом ( $p = 0,04$ ), так и у пациентов 2-й группы ( $p = 0,014$ ). У пациентов, резистентных к пародонтиту, выражена тенденция к росту частоты аллеля DQB1 \*0501 ( $p = 0,049$ ).

На рисунке 1 представлены данные распределения частот специфичностей локуса HLA-DRB1 в группах пациенток с различными формами течения пародонтита и резистентных к нему женщин. При ДНК-типировании

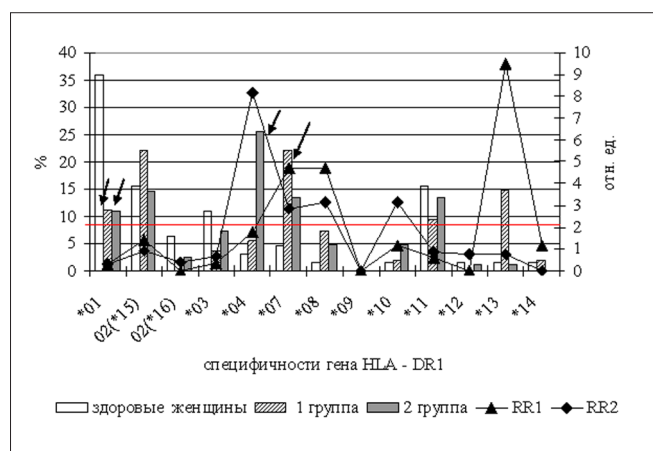


Рис. 1. Распределение частот специфичностей гена DRB1 и показателей относительного риска у пациенток с агрессивной формой течения пародонтита (RR1) и хроническим генерализованным пародонтитом (RR2).

Примечание: здесь и на рис. 2—6 стрелками отмечены статистически достоверные отличия от контрольных значений частот встречаемости специфичностей или аллелей генов HLA

у женщин контрольной группы было выявлено 12 типов специфичностей DRB1, за исключением специфичности \*09. Наиболее частыми из них были специфичности \*01 (35,9%), \*15 (15,6%), \*11 (15,6%), \*03 (10,9%), редкими, каждая по 1,6% - \*08, \*10 \*13, и \*14. У пациенток 1-й группы не выявлены специфичности 02 (\*16), \*09 и \*12, а у пациенток 2-й группы — специфичность \*14. У пациенток обеих групп было показано статистически достоверное снижение частоты специфичности \*01 (11%) по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). Отмечена тенденция роста частоты встречаемости специфичности \*07 (22,2%) по сравнению с контролем (4,7%),  $p = 0,005$ ,  $p_c = 0,07$ , и специфичности \*13 (14,8%) против 1,6% в контроле ( $p = 0,011$ ,  $p_c = 0,143$ ) у пациенток 1-й группы. Статистически достоверное увеличение частоты специфичности \*04 выявлено у пациенток 2-й группы (25,6 и 3,1% в контроле,  $p_c < 0,05$ ). Высокие значения относительного риска могли указывать на возможные положительные ассоциации заболевания у представительниц 1-й группы со специфичностями \*07 (RR = 4,7, CI: 1,41; 15,96) и \*13 (RR = 9,5, CI: 1,22; 73,84), а также \*04 (RR = 8,2, CI: 1,99; 33,75) у представительниц 2-й группы. Однако при введении поправки на

число исследованных специфичностей эти показатели оказались статистически недостоверными.

У мужчин контрольной группы были выявлены все типы DRB1 специфичностей. Специфичность \*14 не определена у пациентов 1-й группы. Характер распределения специфичностей локуса HLA-DRB1 у мужчин с различными формами пародонтита незначительно отличался от распределения частот специфичностей у представителей контрольной группы (рис. 2). Отмечена тенденция снижения частоты специфичности \*01 у пациентов 1-й группы (4,8 %) по сравнению с контролем (20 %),  $p = 0,049$ ,  $p_c = 0,64$  и отрицательные ассоциации с пародонтитом (RR = 0,2, CI: 0,05, 1,02).

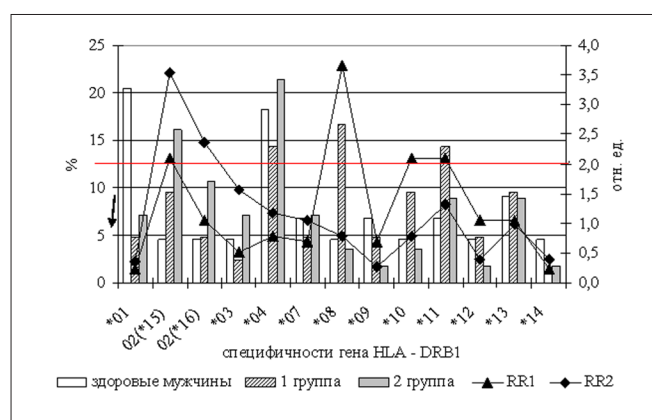


Рис. 2. Распределение частот специфичностей гена DRB1 и показателей относительного риска у пациентов с агрессивной формой течения пародонтита (RR1) и хроническим генерализованным пародонтитом (RR2)

Наиболее частыми аллелями локуса HLA-DQA1 у представительниц контрольной группы были аллели \*0101 (34,4%), \*0501 (26,6%), \*0102 (18,8%) и \*0301 (9,3%); у мужчин — \*0101 (25,0%), \*0501(25,0%), \*0301 (18,2%) и \*0102 (15,9%). Основные отличия в характере распределения аллелей гена HLA-DQA1 у пациентов с пародонтитом и здоровых людей были также выявлены подгруппах, состоящих только из женщин (рис. 3). Так, у пациенток 1-й группы частота аллеля \*0101 (9,3%) была снижена в 3,7 раза по сравнению с частотой встречаемости этого аллеля у женщин, резистентных к пародонтиту (34,4%),  $p = 0,0017$ ,  $p_c = 0,014$ . Этот аллель был выявлен только у 1% женщин 2-й группы ( $p = 0,0004$ ,  $p_c = 0,0032$ ). Значения относительного риска свидетельствовали об отрицательных ассоциациях аллеля \*0101 с пародонтитом. У пациентов 1-й группы была отмечена тенденция увеличения частоты встречаемости аллеля \*0301 (14,8%) по сравнению с

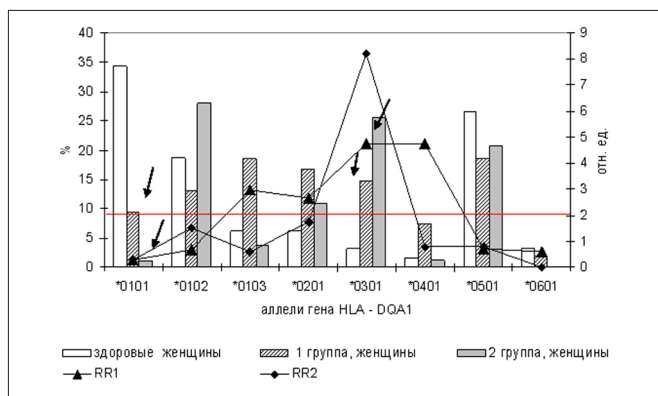


Рис. 3. Распределение частот аллелей гена DQA1 и показателей относительного риска у пациенток с агрессивной формой течения пародонтита (RR1) и хроническим генерализованным пародонтитом (RR2)

контрольной группой (3,1%),  $p = 0,042$ ,  $p_c = 0,336$ . Частота встречаемости аллеля \*0301 у пациенток 2-й группы была статистически достоверно выше (25,6%),  $p = 0,0004$ ,  $p_c = 0,0032$ , чем в контрольной группе. Выявлены положительные ассоциации аллеля \*0301 с хроническим генерализованным пародонтитом ( $RR = 8,2$ ,  $CI:1,99;33,75$ ). Различия в частоте встречаемости аллелей локуса HLA-DQA1 у мужчин со здоровым пародонтом и различными формами пародонтита были статистически недостоверными (рис. 4).

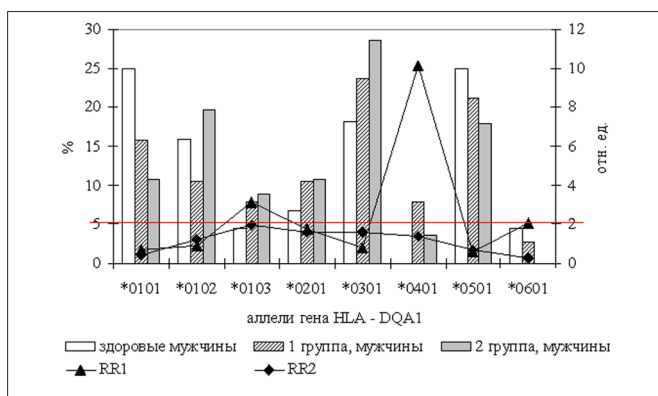


Рис. 4. Распределение частот аллелей гена DQA1 и показателей относительного риска у пациентов с агрессивной формой течения пародонтита (RR1) и хроническим генерализованным пародонтитом (RR2)

В распределении частот аллелей локуса HLA-DQB1 были выявлены наименьшие отклонения от контрольных значений как у мужчин, так и у женщин. Так, в контрольной группе у женщин чаще всего выявляли аллель \*0301 (23,4%), в 1-й группе пациенток его частота составила 18,5%, а во 2-й – 29,3%. У мужчин аллель \*0301 выявляли с частотой 23,5, 21,4 и 10,7%, соответственно. Аллель \*0304 был выявлен только у од-

ной женщины контрольной группы (1,6%) и полностью отсутствовал у всех обследованных людей. Аллель \*0305 также не был выявлен ни в одной группе, за исключением 1 мужчины 1-й группы. У пациенток 2-й группы также не были выявлены аллели \*0503 и \*0601. Так как эти маркеры были выявлены с низкой частотой и в других группах, мы не рассматривали их в качестве факторов чувствительности или резистентности к пародонтиту. Нами также отмечена тенденция к увеличению частоты аллеля \*0302 у женщин с хроническим генерализованным пародонтитом (17,1%) по сравнению с частотой аллеля у женщин, резистентных к пародонтиту (1,9%),  $p = 0,035$ ,  $p_c = 0,385$ ;  $RR = 3,64$ ,  $CI:1,1, 12,2$  (рис. 5). У мужчин с хроническим генерализованным пародонтитом выявлена тенденция к увеличению частоты аллеля \*0601 (10,7%) при полном его отсутствии у здоровых индивидуумов,  $p = 0,033$ ,  $p_c = 0,363$  (рис. 6).

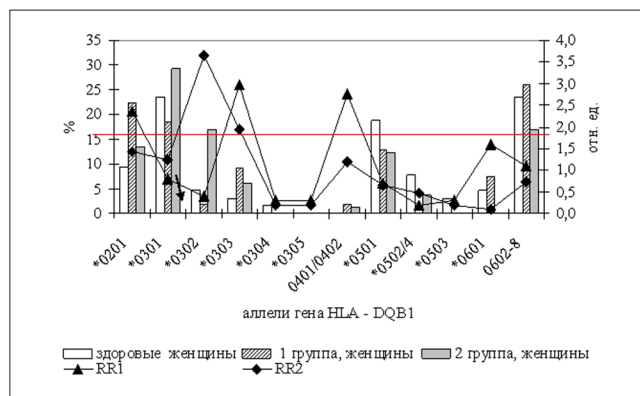


Рис. 5. Распределение частот аллелей гена DQB1 и показателей относительного риска у пациенток с агрессивной формой течения пародонтита (RR1) и хроническим генерализованным пародонтитом (RR2)

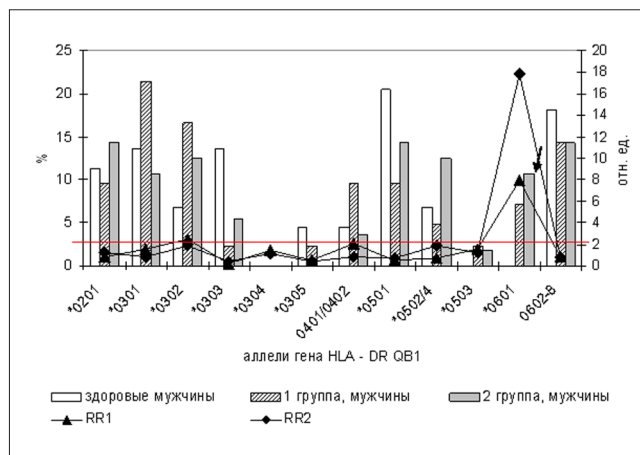


Рис. 6. Распределение частот аллелей гена DQB1 и показателей относительного риска у пациентов с агрессивной формой течения пародонтита (RR1) и хроническим генерализованным пародонтитом (RR2)

Таким образом, в результате проведенных исследований мы не выявили значительных различий в распределении специфичностей и аллелей генов HLA II класса (DRB1, DQA1 и DQB1) у здоровых людей и пациентов с различными формами пародонтита в зависимости от пола индивидуума. По-видимому, это связано с малочисленностью обследованных групп. Было показано статистически достоверное увеличение частоты специфичности DRB1\*04 и аллеля DQA1\*0301 у пациенток 2-й группы ( $p < 0,05$ ). Так как относительный риск при этом был равен 8,2 (CI:2 – 34), можно предполагать наличие положительных ассоциаций специфичности DRB1\*04 и аллеля DQA1\*0301 с хроническим генерализованным пародонтитом у женщин. Низкая частота встречаемости специфичности DRB1\*01 и аллеля DQA1\*0101 у пациенток с различными формами пародонтита может указывать на их протективные свойства. Поэтому наличие этих маркеров у пациента может являться хорошим прогностическим признаком.

При сравнении этих показателей у лиц контрольной группы и в объединенной группе пациентов с различными формами пародонтита (табл. 3) сохранялась такая же тенденция распределения частот аллелей HLA, как и при оценке по группам. Вместе с тем было показано преобладание специфичности DRB1\*01 и аллеля DQA1\*0101 не только у женщин, но и у мужчин контрольной группы по сравнению с больными, а также маркеров предрасположенности к пародонтиту DRB1\*04 и DQA1\*0301 как у женщин, так и мужчин.

Полученные нами результаты частично совпадают с данными Reichert S. et al. [9]. Они также не обнаружили значительных различий по сравнению с контролем в распределении генов HLA у мужчин с агрессивным и хроническим генерализованным пародонтитом. Однако они выявили пониженную частоту встречаемости HLA-DRBblank\* (не-DRB3/4/5\*) и DQB1\*05 у женщин с агрессивным пародонтитом. Только у женщин с хроническим генерализованным пародонтитом отсутствовал

Таблица 3

**Распределение некоторых аллелей генов HLA II класса  
и показателей относительного риска в общей группе больных с пародонтитом и здоровых лиц**

Специфичность	Подгруппа	Здоровые лица		Пациенты с пародонтитом		Достоверность p	Относительный риск	
		n	доля	n	доля		RR	95% CI
HLA-DRB1*01	женщины	23/64	0,359	15/136	0,110	0,000 *	0,31	0,17–0,55
	мужчины	9/22	0,205	6/98	0,061	0,000 *	0,30	0,11–0,79
HLA-DRB1*04	женщины	2/64	0,031	24/136	0,176	0,031	5,65	1,38–23,21
	мужчины	8/22	0,182	18/98	0,184	0,015	1,01	0,48–2,15
HLA-DRB1*07	женщины	3/64	0,047	23/136	0,169	0,115	3,61	1,12–11,59
	мужчины	3/22	0,068	6/98	0,061	0,479	0,90	0,24–3,43
HLA-DQA1*0101	женщины	22/64	0,344	13/136	0,096	0,000 *	0,28	0,15–0,52
	мужчины	11/22	0,250	13/98	0,133	0,038	0,531	0,26–1,09
HLA-DQA1*0301	женщины	2/64	0,031	29/136	0,213	0,007	6,82	1,68–27,78
	мужчины	8/22	0,182	22/98	0,224	0,004 *	1,23	0,60–2,56
HLA-DQA1*0401	женщины	1/64	0,016	5/136	0,037	0,678	2,35	0,28–19,77
	мужчины	0/22	0,000	4/98	0,041	0,632	4,97	1,9–12,99
HLA-DQB1*0602-8	женщины	15/64	0,234	28/136	0,206	0,197	0,88	0,51–1,53
	мужчины	8/22	0,182	14/98	0,143	0,028	0,79	0,36–1,74

Примечание: n – частота аллеля = количество раз встречаемости аллеля (у гомозигот учитывался дважды) / общее количество обследованных индивидуумов x 2,

\*  $p < 0,05$



HLA-DQB1\*0303 и чаще встречался HLA-DQB1\*06 в гомозиготном состоянии. Гомозиготный HLA-DQB1\*06 присутствовал чаще и в целом у женщин с различными формами пародонтита — в нашей работе мы этого не подтвердили.

Следует отметить, что типирование гена DRB1 мы проводили методом ПЦР синтеза ДНК с использованием набора реактивов HLA-ДНК-Тех, позволяющего выявлять специфичности, то есть определенные варианты генного локуса, которые могут включать в себя еще целый ряд полиморфных участков, выявляемых другими, более чувствительными, но значительно более дорогостоящими методами. Известно, что аллели гена DRB1\*04 — 0401, 0402, и 0405 — ассоциированы с высокой чувствительностью к развитию таких заболеваний, как ревматоидный артрит и инсулин-зависимый сахарный диабет, а аллели 0403, 0404 и 0406 определяют резистентность к ним [1, 5]. HLA-белковые специфичности или кодирующие их аллели не только являются генетическими маркерами аутоиммунных заболеваний, но и сами принимают участие в запуске и развитии патологического процесса. Возможно, изучение популяционного полиморфизма аллелей гена DRB1\*04 позволит выявить более строгие положительные или отрицательные ассоциации с различными формами пародонтита, чем выявленные нами.

Таким образом, в представленной работе были показаны некоторые различия в системе HLA у пациентов с различными формами пародонтита в зависимости от пола индивидуума. Причем, у женщин, страдающих пародонтитом, но не у мужчин, различия были более значимыми. Поэтому было бы полезно исследовать возможные связи между некоторыми маркерами HLA и половыми гормонами. Подтверждено мнение о том, что существуют не только прямые взаимосвязи между полом и заболеванием, но также и не прямые по отношению к некоторым факторам HLA системы. Так как ни нами, ни другими авторами не было выявлено сильных ассоциаций, возможно, имеются другие более важные генетические факторы в качестве реальных этиологических факторов. Это означает, что сама система HLA или близко расположенные гены могут влиять, но не полностью определять чувствительность или резистентность к пародонтиту, в частности, колонизацию десен представителями анаэробной пародонтопатогенной флоры. В связи с отсутствием прогностических данных о связях HLA с различными формами пародонтита и видовым составом колонизирующих пародонтопатогенов в настоящее время диагностическую значимость маркеров HLA нельзя оценить окончательно. Тем не менее эти результаты могут быть

важными для дифференцированного диагноза агрессивных и вялотекущих форм заболеваний пародонта.

## Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования установлены характерные для представителей смешанной популяции города Москвы, чувствительных и резистентных к пародонтиту, особенности аллельного полиморфизма генов HLA II класса:

- каждому из генов HLA-DRB1, -DQA1 и -DQB1 присущ широкий спектр аллельного полиморфизма;
- выявлено 13 различных специфичностей гена DRB1, 8 аллелей гена DQA1 и 12 аллелей гена DQB1.

При этом было отмечено, что характер распределения специфичностей аллелей генов HLA II класса у мужчин и женщин смешанной популяции г. Москвы, резистентных и чувствительных к пародонтиту, в целом соответствует аналогичным данным для лиц европеоидной расы, описанным в литературе.

Показаны слабые положительные ассоциации специфичности гена DRB1 \*04 и аллеля DQA1 \*0301 ( $RR > 2$ ,  $p < 0,05$ ), а также отрицательные ассоциации DRB1 \*01 и DQA1 \*0101 ( $p < 0,05$ ) у женщин с хроническим генерализованным пародонтитом.

Выявлены отрицательные ассоциации DRB1 \*01 и DQA1 \*0101 ( $p < 0,05$ ) в группе мужчин с агрессивным и хроническим генерализованным пародонтитом, а также тенденция к положительным ассоциациям специфичности гена DRB1 \*04 и аллеля DQA1 \*0301 ( $RR > 2$ ,  $p < 0,05$ ,  $p > 0,05$ ) с пародонтитом у мужчин.

## Литература

1. Система HLA и патология человека / Под ред. А.А. Баранова, Б.С. Каганова, С.А. Шер, А.Е. Богорад. — М.: Издательский дом «Династия», 2003. — 148 с.
2. Безрукова И.В., Грудянов А.И. Агрессивные формы пародонтита. — М., 2002. — С. 27–49.
3. Денъга О.В., Мороз О.В., Бирюлина Т.В. и др. Антигенный ряд HLA-системы при заболеваниях пародонта // Вісник стоматології. — 1997. — № 3. — С. 293–295.
4. Мащенко И.С., Соколова И.И. Иммуногенетические аспекты генерализованного пародонтита // Журнал... — 2003. — № 4. — С. 44–46. (иммунология?)
5. Маянский Н.А., Маянский А.Н. Номенклатура и функции главного комплекса гистосовместимости человека // Иммунология. — 2006. — № 1. — С. 40–46.



6. Хаитов Р.М., Алексеев Л.П., Трофимов Д.Ю. и др. Изучение роли респираторных вирусов в этиологии и патогенезе бронхиальной астмы // Иммунология. — 2003. — № 2. — С. 96–99.
7. Armitage G.C. *Periodontal diseases: diagnoses* // Ann. Periodontol. — 1996. — Vol. 1. — P. 37–215.
8. Armitage P., Berry G., Matthews J.N.S. *Statistical methods in medical research*. 4<sup>th</sup> ed. — Blackwell Science Ltd, London, 2002.
9. Reichert S., Stein J., Gautsch A., Langner J., Schaller H.G., Machulla H.K.G. Gender differences in HLA phenotype frequencies found in German patients with generalized aggressive periodontitis and chronic periodontitis // Oral Microbiol Immunol. — 2002. — Vol. 17. — P. 360–368.
10. Stein J., Reichert S., Gautsch A., Machulla H.K.G. Are there HLA combinations typical supporting for or making resistant against aggressive and/or chronic periodontitis? // J. Periodont. Res. — 2003. — Vol. 38. — P. 508–517.
11. Takashiba S., Ohyama H., Oyaizu K., Kogoe-Kato N., Murayama Y. HLA genetics for diagnosis of susceptibility to early-onset periodontitis // J. Periodontal. Research. — 1999. — Vol. 34. — P. 374–378.

## FEATURES OF HLA CLASS II GENES POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY DISEASES OF THE PARODENTIUM

E.N. NIKOLAYEVA, V.N. TSAREV, E.A. GORBACHEVA, E.V. IPPOLITOV, T.N. TSAREVA

*Scientific Research Institute and Faculty of Microbiology of the Moscow State Medico-Stomatologic University*

It was established that features of allelic polymorphism of HLA class II genes were characteristic for representatives of the mixed population of Moscow, sensitive and resistant to periodontitis. The wide spectrum allelic polymorphism was inherent to each of HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 genes. 13 various specificity of DRB1 gene, 8 DQA1 gene allele and 12 DQB1 gene allele were revealed. Mode of distribution of the specificity of HLA class II genes allele in men and women of the above population as a whole corresponded to similar data for persons of the europeoid race, described in the literature. Weak positive associations of specificity of DRB1 \*04 gene and DQA1 \*0301 allele ( $RR > 2$ ,  $p < 0,05$ ), and also negative associations of DRB1 \*01 and DQA1 \*0101 ( $p < 0,05$ ) in women with chronic generalized periodontitis were shown. \*01 and DQA1 \*0101 ( $p < 0,05$ ) in group of men with aggressive and chronic generalized periodontitis, and also the tendency to positive associations of specificity of DRB1 \*04 gene and DQA1 \*0301 allele ( $RR > 2$ ,  $p < 0,05$ ,  $p > 0,05$ ) with periodontitis negative associations DRB1 were found out in men.

*Keywords:* periodontitis, HLA class II genes, allelic polymorphism.

## НОВАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА AbsI ИЗ ARTHROBACTER SPECIES 7M06 УЗНАЕТ ОКТАНУКЛЕОТИДНУЮ ПАЛИНДРОМНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК 5'-CC<sup>^</sup>TCCGAGG-3'

В.А. ЧЕРНУХИН\*, Ю.Г. КАШИРИНА, Ю.Э. ТОМИЛОВА, Д.А. ГОНЧАР,  
В.С. ДЕДКОВ, Н.А. МИХНЕНКОВА, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «Сибэнзим», Новосибирск

Обнаружен бактериальный штамм *Arthrobacter species* 7M06, который является продуцентом новой сайт-специфической эндонуклеазы AbsI. Фермент AbsI узнает палиндромную октануклеотидную последовательность ДНК 5'-CC<sup>^</sup>TCCGAGG-3' и гидролизует ее после второго цитозина, образуя, таким образом, 5'-выступающие «липкие» концы, которые совместимы с концами, образующимися при гидролизе ДНК эндонуклеазами рестрикции XhoI (5'-C<sup>^</sup>TCCGAG-3'), PspXI (5'-VC<sup>^</sup>TCCGAGB-3') и Sall (5'-G<sup>^</sup>TCCGAC-3'). Среди всех известных редкоцепящих эндонуклеаз рестрикции AbsI является единственным ферментом, не имеющим сайтов узнавания на стандартных субстратах, таких как ДНК фагов лямбда и T7, а также аденовирусной ДНК типа 2.

**Ключевые слова:** сайт-специфическая эндонуклеаза, эндонуклеаза рестрикции.

Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы, ЭР) являются сайт-специфическими бактериальными ДНК-эндонуклеазами и входят обычно в состав так называемых систем рестрикции-модификации (RM систем). Наиболее широкое практическое применение в молекулярной биологии и биотехнологии нашли ЭР второго типа, которые узнают короткую (как правило, 4-8 п.н.) последовательность ДНК и расщепляют ее внутри или вблизи сайта узнавания. В настоящее время описано более 250 различных сайтов узнавания ЭР второго типа, из которых только 9 представляют собой невырожденные палиндромные восьминуклеотидные последовательности [1].

В данной работе описаны получение и изучение свойств новой сайт-специфической эндонуклеазы AbsI, сайтом узнавания которой является восьминуклеотидная последовательность ДНК 5'-CC<sup>^</sup>TCCGAGG-3'.

### Материалы и методы

Морфологические и биофизические свойства штамма бактерии *Arthrobacter species* 7M06 определяли

стандартным образом [2]. GC-состав хромосомной ДНК этого микроорганизма определяли, как описано ранее [3].

**Выращивание клеток штамма *Arthrobacter species* 7M06.** В качестве компонентов питательной среды для выращивания бактериальных клеток использовалась продукция фирмы «Organotechnie» (Франция). Культивирование проводили при 28 °С в колбах емкостью 700 мл с 300 мл среды LB (1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl, (рН 7,6)) в термостатированных воздушных качалках G-25 («New Brunswick», США) со встряхиванием (170 об/мин). Клетки выращивались в течение двух суток до достижения оптической плотности 2,5 ед. при измерении на длине волны  $\lambda = 550$  нм. Клетки осаждали центрифугированием в течение 30 мин. при 3000 g на центрифуге «Beckman J2-21» («Beckman», США) и замораживали.

**Очистка препарата фермента AbsI.** Все стадии очистки фермента проводили при 4 °С или на льду. Замороженную биомассу (30 г) суспендировали в течение 3 часов в 120 мл буфера А, содержащего 10 mM К-фосфат (рН 7,2), 0,2 M KCl, 0,1 mM ЭДТА, 7 mM 2-меркаптоэтанол. Клетки разрушали ультразвуком на дезинтеграторе Soniprep 150 («MSE», Великобритания) десятью 1-минутными импульсами с 1-минутными интервалами. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 12000 g в течение 30 мин. на центрифуге

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Чернухин Валерий Алексеевич,  
сотрудник НПО «Сибэнзим»,  
630117 Новосибирск, ул. Тимакова 2/12,  
Тел. (3833) 33-49-91,  
E-mail: valera@sibenzyme.ru

«Beckman J2-21». Из полученного супернатанта выделяли фермент AbsI путем хроматографической очистки на трех сорбентах. На первой стадии использовали 40 мл фосфоцеллюлозы P11 («Whatman», Великобритания). Элюцию фермента проводили 400 мл линейного градиента KCl (0,2–0,9 М) в буфере А. На второй стадии использовали 5 мл гидроксипатита («BioRad», США). Фермент вымывали 120 мл линейного градиента К-фосфата (0,01–0,2 М) в буфере А. На третьей стадии использовали 4 мл гепарин-сефарозы («Sigma», США). Элюцию фермента проводили 60 мл линейного градиента KCl (0,3–1 М) в буфере А.

Для тестирования активности ЭР AbsI в хроматографическом профиле аликвоты по 1 мкл из фракций добавляли к 20 мкл реакционной смеси, содержащей 0,8 мкг ДНК рBlueScriptSK(+), предварительно линеаризованной рестриктазой ZrmI, в SE-буфер 5 «G» (10 mM Трис-НCl (рН 7,6), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1 mM ДТТ), смесь инкубировали 15 мин. при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 5 мкл стоп-раствора, содержащего 0,1 М ЭДТА, 0,05% бромфенолового синего и 40% агарозы. Электрофоретическое разделение продуктов реакции проводили в 1%-ном агарозном геле в трис-боратном буфере.

После очистки на гепарин-сефарозе к фракциям, содержащим фермент, добавили БСА до концентрации 0,05 мг/мл и концентрировали диализом против буфера, содержащего 10 mM К-фосфат (рН 7,2), 0,2 М KCl, 0,1 mM ЭДТА, 7 mM 2-меркаптоэтанол и 50% глицерин.

В результате получили 2,5 мл препарата фермента. Препарат AbsI хранили при -20 °С.

**Определение специфичности эндонуклеазы рестрикции AbsI.** В качестве субстратов для определения сайта узнавания AbsI использовали ДНК фагов лямбда и T7, аденовирусную ДНК типа 2 (Ad2), плазмиду рBlueScriptSK(+) (рBS) [4] и специально сконструированную плазмиду рUC19SE, получение которой описано ниже. Продукты гидролиза разделяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле в трис-ацетатном буфере.

Для определения позиции гидролиза узнаваемой последовательности рестриктазой AbsI использовали олигонуклеотидный ДНК-дуплекс, одну из цепей которого метили с помощью  $\gamma$ -[32P]-АТФ и T4-полинуклеотидкиназы. Исходные олигонуклеотиды были синтезированы в НПО «СибЭнзим» (Россия). Продукты ферментативного гидролиза разделяли электрофорезом в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины. Радиоавтографию геля проводили с помощью прибора Cyclone Storage System («Packard Instrument Co.», USA).

Все использованные ферменты и маркеры молекулярной массы ДНК произведены в НПО «СибЭнзим».

Первичную последовательность ДНК определяли методом Сенгера на автоматическом секвенаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США).

## Результаты и обсуждение

Штамм *Arthrobacter species* 7M06 был выделен из природных изолятов в ходе поиска продуцентов рестриктаз, как описано ранее [5]. Определение штамма дало следующие результаты. Клетки штамма сферические, диаметром 0,5 мкм, в парах или одиночные. Грамположительные. Облигатно аэробные. Колонии на агаре Луриа бледно-желтые, гладкие, блестящие, непрозрачные, выпуклые, круглые, 1–2 мм в диаметре. В бульоне со встряхиванием образуют гомогенную муть. Каталазо-положительные, оксидазоотрицательные. Клетки растут при температуре от 4 до 40 °С. GC-состав хромосомной ДНК составляет 75%. Данный штамм определили как *Arthrobacter species* 7M06, а сайт-специфическую эндонуклеазу, выделенную из него, назвали AbsI.

На рисунке 1 приведены данные по расщеплению сайт-специфической эндонуклеазой AbsI различных субстратов. Как видно из рисунка, AbsI не гидролизует ДНК фагов лямбда и T7, а также Ad2 ДНК, однако способен расщеплять плазмиду рBlueScriptSK(+), линеаризованную ферментом ZrmI (сайт узнавания 5'-AGT<sup>^</sup>ACT-3'). При совместном гидролизе рBlueScriptSK(+) рестриктазами Sfr274I (сайт узнавания 5'-C<sup>^</sup>TCGAG-3') и AbsI новые рестрикционные фрагменты не образуются. В связи с этим мы предположили, что AbsI имеет расширенный сайт узнавания фермента Sfr274I. В ДНК плазмиды рBlueScriptSK(+) сайт узнавания Sfr274I (5'-CTCGAG-3') является частью палиндромной последовательности 5'-CCTCGAGG-3', и эта последовательность нуклеотидов в дальнейшем рассматривалась как возможный сайт узнавания фермента AbsI. Для проверки этого предположения нами были синтезированы комплементарные олигонуклеотиды K61 и K62, образующие ДНК-дуплекс (палиндромная восьминуклеотидная последовательность выделена жирным шрифтом):

K61: 5'-gtatcctc**gagg**tcctgatcaaggt-3'

K62: 5'-accttgatcaggac**ctc**gaggatac-3'

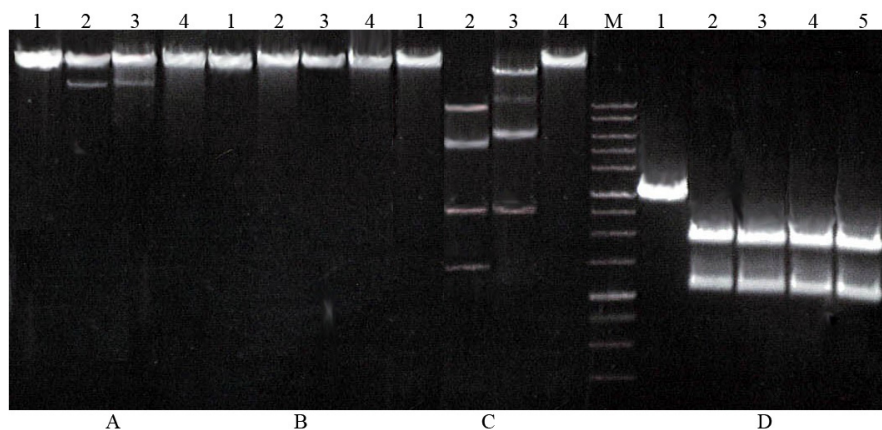


Рис.1. Электрофорез препаратов ДНК фага лямбда (А), фага Т7 (В), Ad2 (С) и плазмиды рBS/ZrmI (D), обработанных рестриктазами Sfr274I, PspXI и AbsI. Дорожки: 1 – исходная ДНК; 2 – гидролиз Sfr274I; 3 – гидролиз PspXI; 4 – гидролиз AbsI; 5 – гидролиз Sfr274I и AbsI; М – 1kb ДНК-маркер

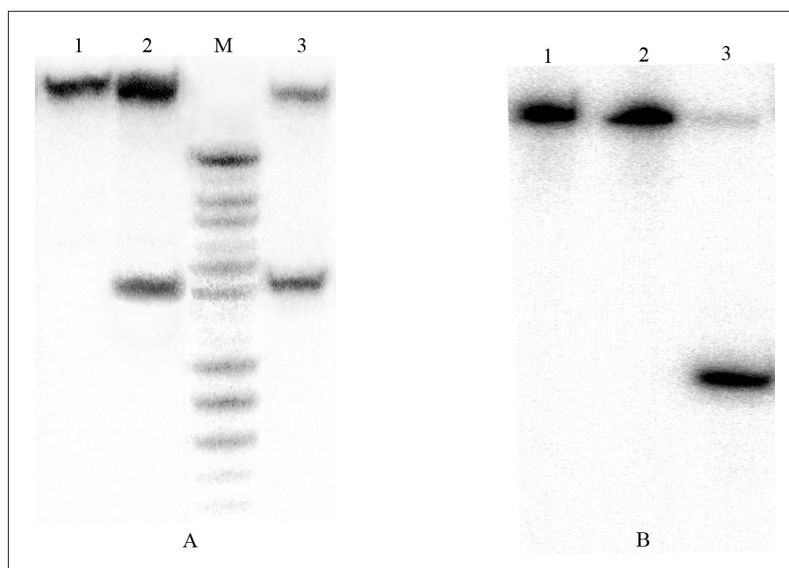


Рис. 2. Определение позиции расщепления ДНК эндонуклеазой рестрикции AbsI с использованием  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-меченных олигонуклеотидных дуплексов K62\*/K61(A) и Xho3\*/Xho4(B).

Дорожки: 1 – исходный дуплекс; 2 – гидролиз рестриктазой AbsI; 3 – гидролиз рестриктазой Sfr274I; М – гидролиз экзонуклеазой III из *E. coli*

Общей частью первичной структуры данного дуплекса и плазмиды рBlueScriptSK(+) является именно последовательность ДНК 5'-ССТСГАГГ-3'. В том случае, если данный олигонуклеотид будет расщепляться ферментом AbsI, последовательность ДНК 5'-ССТСГАГГ-3' будет являться сайтом узнавания этого фермента. На рисунке 2b приведен радиоавтограф электрофоретического разделения продуктов гидролиза олигонуклеотидного дуплекса K62\*/K61 рестриктазами AbsI, Sfr274I, а также экзонуклеазой III из *E.coli*. Как видно из этого рисунка, AbsI расщепляет олиго-

нуклеотидный дуплекс K62\*/K61, а длина фрагмента ДНК, полученного в результате расщепления дуплекса, совпадает с длиной фрагмента ДНК, образованного в результате расщепления рестриктазой Sfr274I.

Следовательно, фермент AbsI узнает последовательность ДНК 5'-ССТСГАГГ-3', а место гидролиза олигонуклеотида ферментами AbsI и Sfr274I совпадает, то есть оба фермента расщепляют ДНК в последовательности 5'-ССТСГАГГ-3' после второго цитозина.

Для определения возможности вырождения установленного сайта узнавания фермента AbsI мы



проанализировали наличие в различных субстратах последовательностей ДНК, отличающихся от последовательности 5'-ССТСГАГГ-3' на один нуклеотид.

В таблице 1 приведены данные по существованию таких нуклеотидных последовательностей в ДНК фагов лямбда и Т7 и в Ad2 ДНК. С учетом симметричности последовательности 5'-ССТСГАГГ-3' всего таких замен возможно 12, из которых 11 содержатся в упомянутых субстратах (табл. 1). Так как AbsI не гидролизует ДНК фагов лямбда и Т7 и Ad2 ДНК, следовательно, присутствующие в них 11 последовательностей ДНК не являются сайтами узнавания AbsI. Последовательность ДНК 5'-ТСТСГАГГ-3' является единственной, отсутствующей в субстратных ДНК, использованных в данной работе (табл. 1).

Для проверки способности фермента AbsI гидролизовать эту последовательность мы синтезировали следующие олигонуклеотиды, образующие ДНК-дуплекс:

Xho3: 5'-gca ata **atc tcg agg** cct aga gga ata agc-3'  
Xho4: 5'-gct tat tcc tct agg **cct cga gat** tat tgc-3'

В указанной первичной структуре последовательность 5'-ТСТСГАГГ-3' и комплементарная ей 5'-ССТСГАГА-3' выделены жирным шрифтом.

На рис. 2а приведена радиоавтография геля после электрофоретического разделения продуктов обработки этого дуплекса ферментами. Как видно на рисунке, фермент AbsI не гидролизует дуплекс Xho3\*/Xho4 (<sup>32</sup>P-меченная цепь обозначена символом \*).

Таблица 1

**Однонуклеотидные замены в сайте 5'-ССТСГАГГ-3' и их наличие в ДНК фагов лямбда и Т7 и Ad2 ДНК**

Однонуклеотидные замены в сайте 5'-ССТСГАГГ-3'	ДНК-субстраты, в которых присутствует сайт (в скобках указаны позиции, с которых начинается последовательность)
5'-АСТСГАГГ-3'*	Фаг лямбда (33497)
5'-ГСТСГАГГ-3'	Ad2 (5777, 8243)
5'-ТСТСГАГГ-3'	—
5'-САТСГАГГ-3'	Фаг Т7 (23430, 31496), Ad2 (24884)
5'-СГТСГАГГ-3'	Фаг лямбда (17654), фаг Т7 (23202), Ad2 (23849, 24203)
5'-СТТСГАГГ-3'	Фаг Т7 (6057, 8975, 18705)
5'-ССАСГАГГ-3'	Ad2 (930)
5'-ССГСГАГГ-3'	Фаг лямбда (10, 3159), Ad2 (11342, 13090, 19053)
5'-ССССГАГГ-3'	Ad2 (16880)
5'-ССТАГАГГ-3'	Фаг Т7 (10310)
5'-ССТГГАГГ-3'	Ad2 (12167, 13183, 14981, 25421)
5'-ССТТГАГГ-3'	Фаг Т7 (82, 13863, 14655, 14982, 19021, 32888, 39006, 39858), Ad2 (9199)

\* жирным шрифтом обозначены нуклеотиды, которые отличаются при сравнении с последовательностью ДНК 5'-ССТСГАГГ-3'



Таким образом, *AbsI* не расщепляет последовательностей ДНК, полученных изменением одного из нуклеотидов в сайте 5'-ССТСГАГГ-3'. Полученные данные подтверждают, что именно невырожденная последовательность нуклеотидов 5'-ССТСГАГГ-3' является сайтом узнавания фермента *AbsI*.

Для проверки сайта узнавания фермента *AbsI* и получения еще одного субстрата для этой эндонуклеазы мы изменили первичную структуру широко используемой плазмиды  $\rho$ UC19, заменив последовательность 5'-GC-3' в положении 437-438 на последовательность 5'-CG-3'. Для этого были синтезированы комплементарные олигонуклеотиды *XhoI* и *Xho2*, формирующие ДНК-дуплекс с выступающими липкими концами, совместимыми с липкими концами, образуемыми при расщеплении рестриктазами *XbaI* (5'-T<sup>^</sup>CTGAG-3') и *HindIII* (5'-A<sup>^</sup>AGCTT-3'):

*Xho1*: 5'-ctagagtcgactgtttaaacctcgaggcatgca-3'

*Xho2*: 5'-agcttgcagtcctcgagggtttaaacagtcgact-3'

Олигонуклеотидный дуплекс сшивался с  $\rho$ UC19, гидролизованой ферментами *XbaI* и *HindIII*, и продуктом лигазной сшивки трансформировали компетентные клетки *E. coli* RR1. Среди полученных в результате трансформации клонов выбрали один, из которого была выделена плаزمида  $\rho$ UC19SE. Плазмиды  $\rho$ UC19SE содержит последовательность 5'-ССТСГАГГ-3' в положении 434-441, что было подтверждено определением нуклеотидной последовательности данной плазмиды. На рисунке 3 приведены результаты расщепления плазмиды  $\rho$ UC19SE, линейаризованной ферментом *DriI* (сайт узнавания 5'-GACNNN<sup>^</sup>NNGTC-3'). Как видно из рисунка, *AbsI* расщепляет линейаризованную плазмиду  $\rho$ UC19SE, тогда как исходная плазмиды  $\rho$ UC19 этим ферментом не гидролизуются (данные не приводятся).

Для определения активности фермента *AbsI* мы также использовали плазмиду  $\rho$ UC19SE. *AbsI* проявляет максимальную активность в специальном реакционном буфере следующего состава: 20 мМ ТрисHCl (при pH 8,0), 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Тритон X-100, 1 мМ ДТТ. За одну единицу активности данной сайт-специфической эндонуклеазы принималось такое минимальное количество фермента, при котором происходит полный гидролиз 1 мкг ДНК плазмиды  $\rho$ UC19SE, предварительно линейаризованной рестриктазой *DriI*, в 50 мкл реакционной смеси, содержащей *AbsI*-реакционный буфер при 37 °С. Полученный нами препарат фермента имел концентрацию 1000 ед/мл.

Среди всех известных редкоцепящих эндонуклеаз рестрикции *AbsI* является единственной эндонуклеазой, не имеющей сайтов узнавания ни на одном из стандартных субстратов (ДНК фагов лямбда и Т7, а также ДНК аденовируса типа 2), используемых при поиске новых ферментов рестрикции.

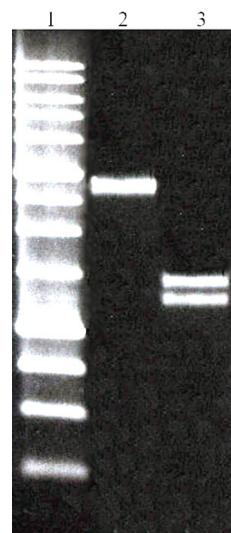


Рис. 3. Расщепление ферментом *AbsI* ДНК плазмиды  $\rho$ UC19SE, линейаризованной *DriI*. Дорожки: 1 – 1kb ДНК-маркер; 2 –  $\rho$ UC19SE/*DriI*; 3 –  $\rho$ UC19SE/*DriI*, обработанная эндонуклеазой *AbsI*

Поскольку *XhoI* и *AbsI* содержат в сайте узнавания одну и ту же палиндромную шестинуклеотидную последовательность 5'-СТСГАГ-3' и расщепляют ее в одном и том же месте, можно предположить, что эволюционно эндонуклеаза *AbsI* произошла из ЭР, узнающей сайт 5'-СТСГАГ-3'. Помимо *AbsI*, *XhoI* и его изошизомеров известно еще несколько ферментов с другой специфичностью, имеющих сайты узнавания с внутренней последовательностью 5'-С<sup>^</sup>ТСГАГ-3'. Среди них можно отметить недавно открытую рестриктазу *PspXI*, узнающую вырожденную восьминуклеотидную последовательность 5'-VC<sup>^</sup>ТСГАГВ-3', которая может рассматриваться как промежуточное звено между ферментами, имеющими шестинуклеотидные и невырожденные восьминуклеотидные сайты узнавания [6]. Кроме того, известен изошизомер *XhoI*, который гидролизует сайт 5'-С<sup>^</sup>ТСГАГ-3' при условии, что перед ним с 5'-конца нет динуклеотида СТ, то есть этот фермент не расщепляет последовательность 5'-СТС<sup>^</sup>ТСГАГ [7].

*AbsI* является новым и перспективным инструментом для генно-инженерных работ, который может быть

использован при крупноблочной фрагментации ДНК. Помимо этого, поскольку при расщеплении по сайту узнавания AbsI образуются такие же липкие концы, как при гидролизе рестриктазами XhoI (5'-C<sup>^</sup>TCGAG-3'), PspXI (5'-VC<sup>^</sup>TCGAGB-3') и Sall (5'-G<sup>^</sup>TCGAC-3'), новая сайт-специфическая эндонуклеаза AbsI может применяться совместно с этими ферментами при клонировании фрагментов ДНК.

### Литература

1. Roberts R.J., Vincze T., Posfai J., Macelis D. REBASE restriction enzymes and methyltransferases // Nucleic Acids Research. — 2003. — Vol. 31. — P. 418–420.
2. *Определитель бактерий Берджи* / Под ред. Дж. Хоулта и др.: 9-е издание в 2-х томах: Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина. — М., 1997.
3. Дедков В.С. Определение GC-состава в ДНК бактерий при помощи эндонуклеаз рестрикции // Биотехнология. — 2004. — № 4. — С. 77–82.
4. Short J.M., Fernandez J.M., Sorje J.A., Huse W.D. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties // Nucleic Acids Research. — 1988. — Vol. 16. — P. 7583–7600.

5. Белавин П.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Метод определения эндонуклеаз рестрикции в колониях бактерий // Прикладная биохимия и микробиология. — 1988. — Т. 24. — № 1 — С. 50–51.
6. Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Беличенко О.А., Дедков В.С., Мезенцева Н.В., Томилова Ю.Э., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции PspXI узнает необычную последовательность ДНК 5'-VCTCGAGB-3' // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2005. — Т. 1 — № 1. — С. 18–23.
7. Gingeras T.R. and Brooks J.E. Cloned restriction/modification system from *Pseudomonas aeruginosa* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1983. — Vol. 80. — P. 402–406.

### Список сокращений:

RM система — система рестрикции-модификации,  
 ЭР — эндонуклеаза рестрикции,  
 Трис — трис-(оксиметил)-аминометан,  
 ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота,  
 ДТТ — дитиотрейтол,  
 п.н. — пары нуклеотидов,  
 Ad2 — аденовирус типа 2,  
 pBS — плаزمида pBlueScriptSK(+),  
 БСА — бычий сывороточный альбумин.

## NEW EIGHT BASES CUTTER AbsI FROM ARTHROBACTER SPECIES RECOGNIZES PALINDROMIC DNA SEQUENCE 5'-CC<sup>^</sup>TCGAGG-3'

V.A. CHERNUKHIN, Ju.G. KASHIRINA, Ju.E. TOMILOVA, D.A. GONCHAR,  
 V.S. DEDKOV, N.A. MIKHENKOVA, S.Kh. DEGTYAREV

*SibEnzyme Ltd., Novosibirsk*

Bacterial strain *Arthrobacter species* 7M06 producing site-specific endonuclease AbsI has been discovered. AbsI recognized palindromic octanucleotide DNA sequence 5'-CC<sup>^</sup>TCGAGG-3' and hydrolyzes it after second cytosine, producing 5'- sticky ends, which were compatible with sticky ends after DNA cleavage by restriction endonucleases XhoI (5'-C<sup>^</sup>TCGAG-3'), PspXI (5'-VC<sup>^</sup>TCGAGB-3') and Sall (5'-G<sup>^</sup>TCGAC-3'). Among all known rare-cutting site-specific endonucleases AbsI was the only enzyme which has no recognition sequences in standard substrates Lambda and T7 DNA and Adenovirus type 2 DNA.

*Keywords:* site-specific endonuclease, restriction endonuclease.

# УСКОРЕНИЕ ПРОЦЕССА БИОТЕРМИЧЕСКОЙ САНАЦИИ И ПОСЛЕДУЮЩЕГО КОМПСТИРОВАНИЯ ТВЕРДЫХ КОММУНАЛЬНЫХ ОТХОДОВ ПРИ МЕХАНИЗИРОВАННОЙ ПЕРЕРАБОТКЕ

А.В. ГАРАБАДЖИУ<sup>1\*</sup>, В.А. ГАЛЫНКИН<sup>2</sup>, Г.В. КОЗЛОВ<sup>1</sup>, Г.Г. НЯНИКОВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет),

<sup>2</sup> Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия

В работе предложен оригинальный метод ускорения процессов биотехнологического компстирования твердых коммунальных отходов. Разработан новый подход к выбору активаторов и расчету их количества. Использование этих подходов на практике позволило сократить сроки созревания компоста в два раза. Расход активаторов снижен с традиционных 5–15% до 0,00007–0,00025% от массы отходов.

**Ключевые слова:** твердые коммунальные отходы, механизированное компстирование, кинетика роста микроорганизмов, биотехнология.

В настоящее время весь мир и, в частности, наша страна находится в стадии стремительного роста городов. Применительно к России урбанизация проходит на фоне значительного расслоения населения и массовой миграции сельского населения в крупные города. Рост населения городов сопровождается резким увеличением количества бытовых отходов. Стабилизация экономической ситуации в стране также ведет к росту потребления и соответственно увеличению количества твердых коммунальных отходов (ТКО). Таким образом, всегда существовавшая проблема ТКО становится сегодня еще более актуальной.

Основным способом переработки ТКО являются биотехнологические процессы и сжигание. К сожалению, отсутствие достаточного количества современных биотехнологических производств приводит к тому, что основная масса отходов захоранивается на полигонах или сжигается. Сгорание органической части ТКО, вопреки утверждениям сторонников метода, не

сокращает, а увеличивает их массу (на 1 кг углерода расходуется более 2,5 кг кислорода) и переводит в газообразное состояние; при этом образуется токсичная зола и супертоксичные диоксины. Происходит потеря органических веществ, которые можно переработать в удобрения и использовать для озеленения и сельского хозяйства.

Очевидно, что самым экологически и экономически перспективным является биотехнологический способ переработки, при котором обеззараживание ТКО происходит без затрат энергоносителей (за счет активности термофильных микроорганизмов), а органические компоненты перерабатываются в компост.

## Материалы и методы

Эксперименты проводились на базе предприятия «Опытный завод механизированной переработки бытовых отходов» (ОЗ МПБО) с использованием штатного оборудования (рис. 1–3).

Для приготовления и внесения в ТКО растворов питательных веществ была разработана и изготовлена специальная установка (рис. 2).

Измерения температуры ТКО в биобарабанах проводили пирометром с учетом поправки (корректировалась раз в смену), температуру компоста в буртах (рис. 4) на глубине 0,5 м — максимальным термометром, физико-химические параметры компоста — по стандартным методикам.

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Гарабаджиу Александр Васильевич,  
д.х.н., профессор, заведующий кафедрой  
технологии микробиологического синтеза  
Санкт-Петербургского государственного  
технологического института  
198013 Санкт-Петербург, Московский пр-т, 26  
Тел.: (812) 495-74-01  
Тел./факс: (812) 315-14-36  
E-mail: gar@siteks.spb.ru



Рис. 1. Внешний вид барабанного биореактора (биобарабана)

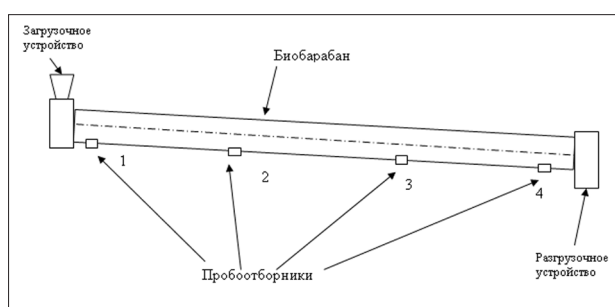


Рис. 2. Расположение пробоотборников на биобарабане



Рис. 3. Установка для приготовления питательных растворов



Рис. 4. Дозревание компоста в штабеле

## Результаты и обсуждение

Если рассмотреть процесс механизированного компостирования с точки зрения кинетики роста микроорганизмов, то становится ясным, что при компостировании отходов — периодическом культивировании микроорганизмов, содержащихся в исходных ТКО — питательной средой выступает органическая часть отходов.

Обычно все 4 фазы протекают в одном реакторе. На заводе МПБО эти стадии разделены. Лаг-фаза и фаза экспоненциального роста, а также часть стационарной фазы протекает в биобарабане. По сути дела лаг-фаза и фаза экспоненциального роста — это выход процесса на температурный режим, а собственно санация ТКО протекает в начале стационарной фазы. Разумеется, это относится лишь к доминирующей на конечном этапе биотермической санации, целевой группе микроорганизмов — термофилам. Микроорганизмы мезофильной группы, которые доминируют на начальном этапе, обеспечивают разогрев массы ТКО до температур, когда в дело вступают термофилы, в дальнейшем и гибнут в биобарабане. Роль мезофилов и скорость выхода процесса на темпе-

ратурный режим различны в зависимости от исходной температуры ТКО. В плане кинетики роста следует отметить, что мезофилы не успевают перейти в стационарную фазу роста — при повышении температуры они сразу переходят в фазу лизиса.

Численность микроорганизмов сильно зависит от условий в биореакторе, которые неодинаковы по его длине.

В таблице 1 приведено количество микроорганизмов в различных участках биореактора.

В условиях резкого снижения интенсивности перемешивания и аэрации микроорганизмы продолжают разрушать остаточные органические субстраты и поддерживать температуру компоста. Эта стадия называется «дозревание». По мере исчерпания запасов питательных веществ микроорганизмы переходят в фазу лизиса, что сопровождается остыванием компоста. Процесс продолжается от 8 месяцев до 1,5 лет. В течение этого времени завершаются процессы разложения органических веществ, происходит падение температуры до 30 °С и ниже. Микробное число снижается с  $9 \times 10^{10}$  до  $4 \times 10^7$ , рН стабилизируется на уровне 8,13–8,17. По завершении



стадии дозревания количество микроорганизмов падает и стабилизируется к моменту остывания компоста на уровне  $10^7$  (табл. 2).

**Таблица 1**  
**Содержание микроорганизмов в пробах**

Параметр	Пробоотборник (см. рис. 2)			
	1	2	3	4
ОМЧ	$6,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	Более $10^9$
Микро-мицеты	$3,3 \times 10^4$	—	—	—

**Таблица 2**  
**Изменение микробиологических показателей компоста при дозревании в штабелях**

Проба	Свежий (менее 1 месяца)	0,5 года	1,5 года
ОМЧ	$7,8 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	$4,6 \times 10^7$
Микро-мицеты	$4,3 \times 10^5$	$6,0 \times 10^4$	$1,8 \times 10^5$

Ввиду многообразия микроорганизмов на начальном этапе процесса и смене микробных сообществ по мере его протекания некорректно использовать содержание микроорганизмов того или иного вида (или ОМЧ) в качестве параметра, по которому можно судить о кинетике процесса. Более универсальным параметром, отражающим интенсивность протекания микробиологических процессов, является температура компостируемого субстрата. График ее изменения повторяет, разумеется, с некоторым временным сдвигом, кривую роста микроорганизмов. Поэтому в качестве основного контрольного параметра мы использовали температуру компоста.

Ознакомившись с тем, что сделано в области активации компостирования до нас, мы пришли к выводу о том, что все исследователи данной проблемы подошли к ней стереотипно, приняв как данность, что соотношение углерод/азот/фосфор нужно довести до 20/5/1 на всю массу отходов и то, что делать это нужно с помощью других отходов, главным образом, навоза или илового осадка станций аэрации. Второй стереотип — для активации нужно вносить извне микроорганизмы деструкторы (классические дозировки —  $10^6$  к.о.е. на г ( $\text{см}^3$ ) или 5–15% от объема инокулируемой среды). Разработанная на основе стереотипного подхода технология ускорения компостирования ТКО [1, 2], несмотря на хорошие

результаты, так и не была внедрена в производство по экономическим соображениям.

Никто не отметил того обстоятельства, что собственно главным препятствием для роста микроорганизмов, которые в избытке содержатся в ТКО, является низкая растворимость питательных веществ субстрата. Этим и объясняется длительная лаг-фаза процесса и низкая физиологическая активность микрофлоры мусора, которая и является движущей силой процесса разогрева отходов. Мы предположили следующее:

- необходимо вносить в качестве активаторов только самые доступные источники питания (сахара и белковые гидролизаты) в виде водных растворов, что позволит до минимума сократить лаг-фазу процесса;
- количество питательных веществ должно быть эквивалентно тому количеству, которое будет затрачено на приготовление инокулюма, исходя из классических дозировок —  $1 \times 10^6$  к.о.е./ $\text{см}^3$ .

Следуя логике, для экспериментов следовало бы взять стандартный состав среды для определения ОМЧ, однако мы поступили следующим образом. Мы создали два варианта среды: первая — смесь сула с пептоном и сахарозой (наиболее легкодоступные источники питания), второй вариант представлял собой стереотипную питательную среду (углерод/азот/фосфор = 20/5/1) на основе сахарозы и минеральных удобрений; в состав среды был также включен в качестве активатора лигногумат. Состав сред на одну загрузку биобарабана (300 тонн ТКО):

**Среда 1**

Концентрат кислого сула	— 1 кг
Сахароза	— 1 кг
Пептон	— 0,2 кг

**Среда 2**

Сахароза	— 4 кг
Аммиачная селитра	— 1,5 кг
Азофоска	— 0,1 кг
Лигногумат сухой	— 0,2 кг

Результаты экспериментов (рис. 5), проведенных при различных температурах исходных ТКО (в разные времена года), говорят о том, что внесение активаторов эффективно при любых исходных температурах, однако наибольший эффект наблюдается при низких температурах. Особенно ярко видно это на графиках с исходной температурой  $15^\circ\text{C}$  — максимум температур, наблюдаемый на 20-й час ферментации есть ни что иное,



как следствие подогрева биобарабана ИК излучателями. Однако физиологическая активность исходной микрофлоры низка, а ее количество мало, поэтому процесс переходит в экспоненциальную фазу лишь через 8 ч после разогрева до оптимальных температур. В случае активатора, созданного на основе суслы и пептона, процесс начинается сразу после искусственного разогрева. Наблюдения за температурой компоста при дозревании (рис. 6) и его физико-химическими характеристиками (табл. 3) при дозревании в штабелях показали, что до-

бавки, как и предполагалось, влияют лишь на интенсивность протекания процессов. Особенности изменения температуры, рН и органического вещества одинаковы для обеих добавок и контроля, однако скорость их протекания различна.

Полученные результаты позволяют говорить о том, что внесение активаторов сокращает время созревания компоста в буртах в 2 раза, а сроки пребывания ТКО в биобарабане (за счет сокращения времени выхода на температурный режим) – на 20–38%.

Таблица 3

## Влияние активирующих добавок на основные показатели компоста при дозревании

Показатель	Время дозревания, месяцы								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Компост с активатором на основе пептона и углеводов									
Органическое вещество, %	42	40	39	32	31				
t, °C	60	56	58	30	29				
рН водной вытяжки	6,80	7,91	7,80	8,10	8,13				
Компост с активаторами на основе минеральных удобрений и углеводов									
Органическое вещество, %	45	45	44	42	38	34	31		
t, °C	65	52	43	55	65	55	32		
рН водной вытяжки	6,60	7,70	6,86	7,80	7,70	8,50	8,14		
Контрольный штабель									
Органическое вещество, %	52	48	44	41	38	36	33	31	29
t, °C	47	50	40	30	45	35	45	45	25
рН водной вытяжки	6,80	7,90	7,60	7,70	7,25	7,89	7,50	7,98	8,17

**Заключение**

1. При поиске способов оптимизации биотехнологических процессов следует избегать стереотипов и рассматривать протекание процесса с точки зрения фундаментальных основ биотехнологии.

2. Лимитирующей стадией процесса биотехнологической переработки твердых коммунальных отходов является фаза адаптации к источникам питания, или лаг-фаза. Эта стадия процесса является лимитирующей и для других процессов деструкции трудно растворимых веществ, а, следовательно, метод, предложенный в

статье, может быть использован и при активации других биотехнологических процессов.

3. Внедрение метода позволило без капиталовложений увеличить производительность предприятия на 20%.

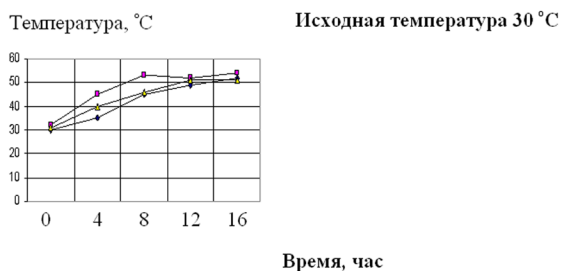
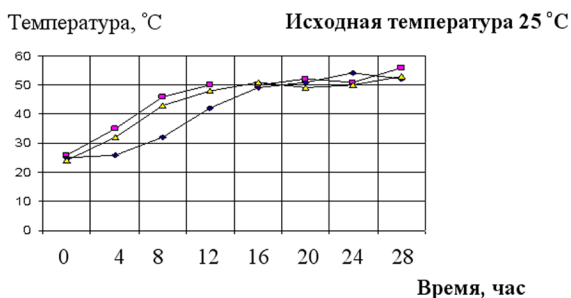
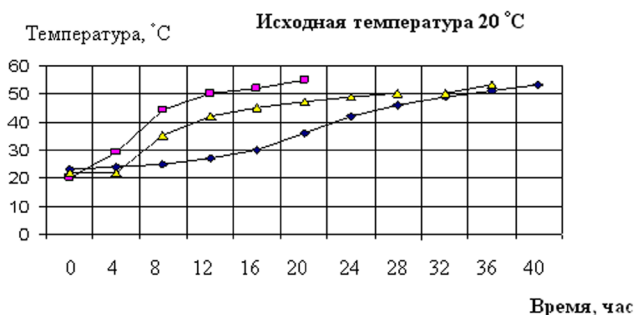
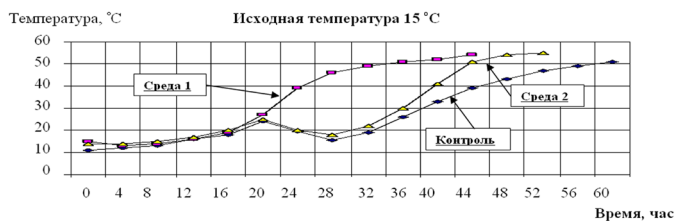


Рис. 5. Влияние добавок и исходной температуры ТКО на выход биобарабана на температурный режим

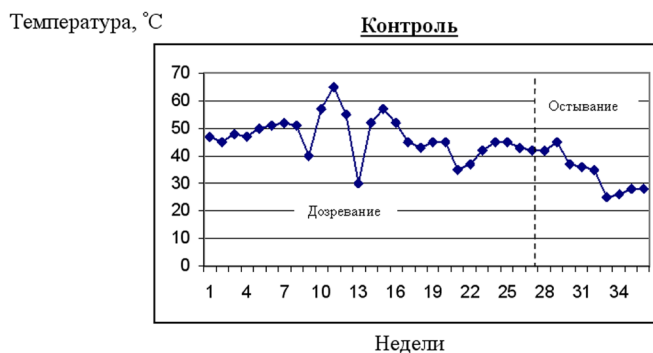
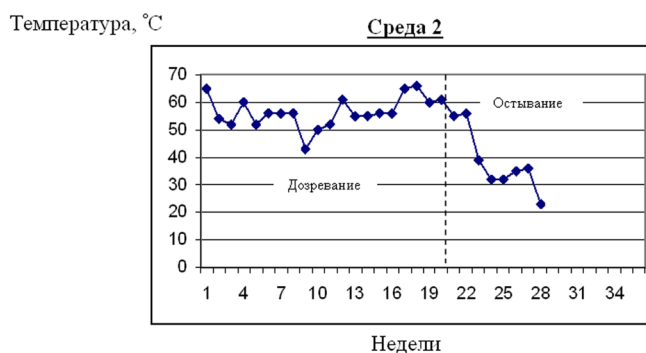
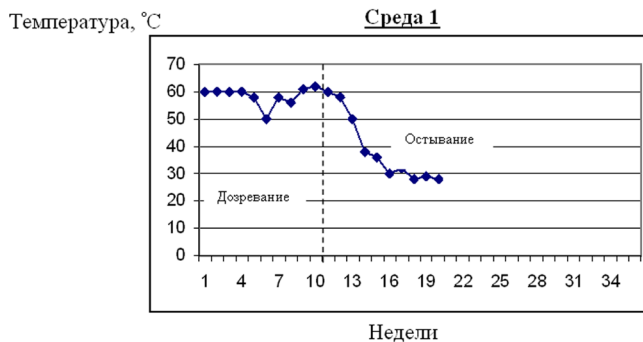


Рис. 6. Влияние активаторов на скорость дозревания (остывание до 30 °С и ниже) компоста из ТКО

## Литература

1. Архипченко И.А., Федашко М.Я., Орлова О.В. и др. Применение микробных удобрений для интенсификации процесса ферментации муниципальных отходов / Тез. докл. конференции «Экология и промышленность России». — М., 2000. — С. 16–19.
2. Архипченко И.А., Орлова О.В. Способы повышения качества компоста из муниципальных отходов / Экологические аспекты переработки отходов большого города: Тез. докл. — СПб.: СПбГУ НИИХ, 2001. — С. 102–118.

**AN ACCELERATION OF THE BIOTERM SANATION PROCESS AND  
FOLLOWING COMPOSTING OF THE HARD EVERYDAY RUBBISH  
IN THE TIME OF MECHANIZED TREATMENT**

A.V. GARABADGIU, V.A. GALINKIN,  
G.V. KOZLOV, G.G. NANIKOVA

*St.-Petersburg State Technological Institute (Technical University),  
St.-Petersburg Chemically-Pharmaceutical Academy*

An original method for acceleration of the composting processes of the hard everyday rubbish was provided according to the present work. New method for a choice of activators and calculation of their quantity were provided as well. The use of such methods in practice enabled to reduce the composting ripening period by half. The quantity of activators was decreased from conventional 5–15% of the rubbish mass to 0.00007–0.00025%.

*Keywords:* the hard everyday rubbish, mechanized composting, microorganisms growth speed.

## ПОВЫШЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ ПРЕПАРАТАМИ РНК

Т.А. ТЕРЕЩЕНКО, Г.М. ЛЕВАГИНА, В.И. МАСЫЧЕВА, А.О. БЕЛКИНА\*

*Институт медицинской биотехнологии ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор»,  
Бердск-10, Новосибирской области*

В настоящее время в лечении инфекционных заболеваний человека ведущая роль принадлежит антибиотикам. Основным терапевтическим действием антибиотиков является подавление жизнедеятельности возбудителя инфекции в результате угнетения более или менее специфического для микроорганизмов метаболического процесса. Угнетение происходит в результате связывания антибиотика с мишенью, в качестве которой может выступить либо фермент, либо структурная молекула микроорганизма.

Однако бактерии способны синтезировать ферменты, инактивирующие некоторые антибиотики. Поэтому в клинической химиотерапии имеется тенденция применять комбинации двух и более средств. При этом возможно решение следующих задач: расширение спектра антимикробного действия, снижение токсичности препаратов в результате уменьшения доз, уменьшение формирования резистентности штаммов патогенных микроорганизмов, увеличение проницаемости клеточной стенки микроорганизма для антимикробного средства, вовлечение других механизмов противомикробной защиты и т.д. Поиск таких комбинаций препаратов — одна из актуальных задач химиотерапии.

В данной работе представлялось перспективным изучить влияние препарата Ридостин, действующим началом которого является двуспиральная РНК (дсРНК) из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, на антимикробную активность ципрофлоксацина.

**Материалы и методы.** Na-соль двуспиральной рибонуклеиновой кислоты (ФСР 42-0197076901) (субстанция Ридостин) — производство ООО «Ди-фарм», г. Бердск, Новосибирской обл., представляет собой смесь двуспиральной — дсРНК и высокополимерной — впРНК киллерного штамма *S. cerevisiae* с соотношением 18–20% и 78–80% РНК, соответственно. Тест-штамм *Pseudomonas aeruginosa* ATCE 9027 получен из ГИСК им. Л.А. Тарасевича (Москва). Ципрофлоксацин — производство фирмы Promed Export (Индия). Антимикробное действие антибиотика в сочетании с РНК исследовали на плотной и жидкой среде. Изучение антимикробного действия на плотной среде проводили методом диффузии в агар луночным способом. Среды в чашки Петри заливали двумя слоями. Верхний слой содержал суспензию бактерий *Ps. aeruginosa*. Контрольные и испытуемые растворы вносили по 100 мкл в лунки диаметром 8 мм. Контрольные растворы содержали антибиотик в количестве 2,5; 5,0; 10,0 50,0 и 100,0 мкг/мл; испытуемые растворы содержали комбинации из такого же количества антибиотика и препарат РНК — 5,0 или 10,0 мг/мл. Чашки Петри помещали в термостат при температуре 37 °С на 24 ч. Результат действия ципрофлоксацина и его комбинаций с РНК оценивали по величине диаметра зоны задержки роста *Ps. aeruginosa*. Исследование влияния ципрофлоксацина и его комбинаций с препаратом РНК на рост *Ps. aeruginosa* в жидкой питательной среде проводили следующим образом. Жидкие питательные среды, содержащие 10, 5 и 2,5 мкг/мл антибиотика служили контролем. Испытуемые среды содержали такие же количества антибиотика и 5 мг/мл нуклеиновых кислот. Все растворы разливали в 5 мл пробирки и вносили в них суспензию *Ps. aeruginosa* из расчета 1000 микробных тел в 1 мл питательной среды. Пробирки с растворами инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 ч. Через 1, 2, 3, 4, 5 и 24 ч из проби-

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Белкина Альбина Олеговна,  
начальник отдела Института медицинской биотехнологии  
ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
633010 Новосибирская область, г. Бердск-10, а/я 112,  
НИКТИ БАВ  
Тел.: 8 (38341) 5-19-60  
E-mail: belkina@sibmail.ru

рок отбирали пробы и делали высевы на плотные среды. Высевы инкубировали при температуре 37 °С. Через 24 ч проводили подсчет выросших на плотной среде колоний *Ps. aeruginosa*.

**Результаты и обсуждение.** Влияние антимикробной композиции антибиотика цiproфлоксацина и РНК на рост микроорганизмов рода псевдомонад было изучено на жидкой и плотной среде.

Выбор антибиотика цiproфлоксацина обусловлен тем, что он широко применяется в лечебной практике в качестве противомикробного средства широкого спектра действия, в том числе против псевдомонад. Это производное фторхинолона ингибирует ДНК-гиразу, вследствие чего нарушается репликация ДНК и синтез клеточных белков бактерий, что приводит к быстрому снижению способности бактерий к делению. Препарат действует не только на делящиеся клетки, но и на находящиеся в периоде покоя, так как вызывает лизис клеточной стенки. Препарат имеет обширный перечень побочных эффектов.

Выбор препарата «Na-соль двуспиральной рибонуклеиновой кислоты», являющегося субстанцией лекарственного препарата Ридостин, для изучения синергетического действия антибиотика и НК обусловлено тем, что в настоящее время для лечения вирусных и бактериальных заболеваний человека и животных все чаще применяются индукторы интерферона на основе природных нуклеиновых кислот (НК) [1–7]. В качестве потенциальных терапевтических средств исследуются как высокополимерные, так и олигонуклеотиды. К числу таких препаратов относится препарат рибонуклеиновых кислот Ридостин, который, как показали результаты медико-биологических исследований, обладает широким спектром действия на систему цитокинов: на синтез интерферона-альфа, фактора некроза опухолей альфа, интерлейкина-1; стимулирует активность макрофагов и нейтрофилов; нормализует состояние Т-клеточного иммунитета; проявляет антагонистическое действие на внутриклеточные микроорганизмы и вирусы. Перечисленные выше свойства Ридостина — индуктора интерферона, позволяют рассматривать препараты на основе дсРНК в качестве перспективных для терапии многих инфекций. Для микобактерий, например, показано подавление размножения патогенных и непатогенных штаммов модифицированными и немодифицированными антисенс-олигонуклеотидами [8–9]. Получены данные *in vitro* об угнетении жизнеспособности фагоцитированных микобактерий и снижении способности фагоцитированных микобактерий разрушать макрофаги

под влиянием препарата Ридостин [6]. Рибоолигонуклеотиды различной структуры могут ингибировать рост культуры *Candida albicans* [10].

Представитель рода псевдомонад — *Ps. aeruginosa* был выбран вследствие того, что этот микроорганизм вызывает трудно поддающиеся лечению инфекции. Псевдомонады резистентны к большинству противомикробных препаратов. Для борьбы с этими микроорганизмами вынуждены применять повышенные дозы антибиотиков; обычно это аминогликозиды, пенициллины, цефалоспорины, хлорамфениколы и т.д. В России устойчивость микроорганизмов к фторхинолонам (цiproфлоксацину и офлоксацину) является реальной проблемой при лечении нозокомиальных инфекций. Быстрее всего резистентность формируется у штаммов *Ps. aeruginosa*, растет устойчивость к фторхинолонам и среди пневмококков.

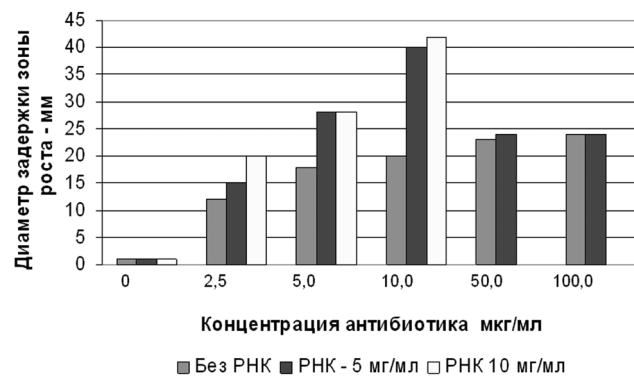


Рис. 1. Влияние концентрации цiproфлоксацина в диапазоне 2,5–100,0 мкг/мл на задержку роста *Ps. aeruginosa* на плотной среде при добавлении РНК 5 и 10 мг/мл

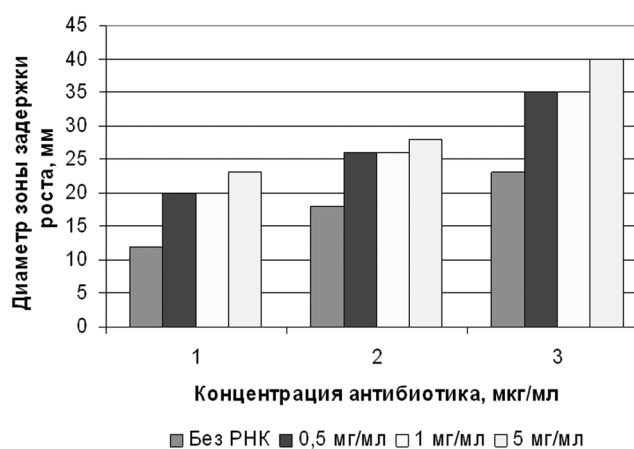


Рис. 2. Влияние концентрации цiproфлоксацина в диапазоне 2,5–10,0 мкг/мл на задержку роста *Ps. aeruginosa* на плотной среде при добавлении РНК 0,5, 1,0 и 5,0 мг/мл



Результаты изучения антимикробного действия ципрофлоксацина и его комбинаций с препаратом нуклеиновых кислот на рост *Ps. aeruginosa* на плотной среде представлены на рисунках 1 и 2.

Показано, что подавляющее действие ципрофлоксацина на клетки *Ps. aeruginosa* при увеличении концентрации ципрофлоксацина в 10 раз (от 10 мкг/мл до 100 мкг/мл) изменяется незначительно (диаметры зон задержки роста *Ps. aeruginosa* 20 и 24 мл, соответственно). При низких концентрациях антибиотика (10, 5 и 2,5 мкг/мл) внесение нуклеиновых кислот значительно усиливает ингибирующее действие ципрофлоксацина на рост *Ps. aeruginosa*: при его концентрации 10 мкг/мл — в два раза.

При исследовании влияния ципрофлоксацина и его комбинаций с препаратом НК на рост *Ps. aeruginosa* в жидкой питательной среде также показано (табл. 1), что действие ципрофлоксацина в сочетании с рибонуклеиновыми кислотами на рост *Ps. aeruginosa* эффективнее, чем действие одного антибиотика. Раствор ципрофлоксацина с содержанием 2,5, 5 и 10 мкг/мл не является бактерицидным, в то время как при внесении 5 мг/мл препарата НК комбинация даже с концентрацией антибиотика 2,5 мкг/мл становится бактерицидной для *Ps. aeruginosa* уже через 4 ч инкубации (табл. 1).

Как видно из таблицы, композиция антибиотика и препаратов НК оказывает более выраженный антимикробный эффект по сравнению с антибиотиком в той же концентрации. Подобный синергетический эффект *in vitro* обуславливает возможность снижения дозы антибиотиков при лечении бактериальных инфекций, что весьма актуально, поскольку антибиотики имеют, как правило, обширный спектр побочных эффектов.

Механизм действия дсРНК, как и вообще экзогенных РНК, в различных клетках до конца не изучен. Например, помимо индукции интерферона, интерферогенная РНК дрожжей снижает синтез ДНК, РНК и белка в первичной культуре мононуклеарных клеток крови человека, о чем свидетельствует уменьшение включения в них тимидина, урацила и лейцина, меченных по тритию. Показано, что олигонуклеотиды могут влиять на экспрессию генов, блокировать трансляцию мРНК с помощью различных, до конца не изученных механизмов. Одним из возможных механизмов представляется торможение функции рибосом. Важным моментом при этом является возможность проникновения антимикробных препаратов в клетку. Бактериальные клетки, в отличие от клеток высших организмов (в особенности животных), имеют клеточную оболочку, обладающую

достаточной толщиной и высокой прочностью. Клеточная стенка играет существенную роль в избирательности действия различных антимикробных средств. Активность антимикробного средства зависит от его способности проникать в клетку.

Таблица 1

**Влияние ципрофлоксацина и его комбинаций с препаратом НК на рост *Ps. aeruginosa* в жидкой питательной среде**

Длительность экспозиций, ч	Концентрация антибиотика					
	10 мкг/мл		5 мкг/мл		2,5 мкг/мл	
	Без РНК	5 мг/мл РНК	Без РНК	5 мг/мл РНК	Без РНК	5 мг/мл РНК
1	Спл. рост	Спл. рост	Спл. рост	Спл. рост	Спл. рост	Спл. рост
2	$2 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^7$	Спл. рост	Спл. рост	Спл. рост	Спл. рост
3	$1,1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^6$	Спл. рост	Спл. рост	Спл. рост
4	$3 \cdot 10^6$	Отс	$7 \cdot 10^6$	Отс	Спл. рост	$1,8 \cdot 10^6$
5	$2,5 \cdot 10^6$	Отс	$7 \cdot 10^6$	Отс	Спл. рост	Отс
24	$2 \cdot 10^6$	Отс	$7 \cdot 10^6$	Отс	Спл. рост	Отс

Известно, что клеточная стенка грамотрицательных бактерий обеспечивает большую «устойчивость» к диффузии антибиотика, чем клеточная стенка грамположительных микроорганизмов. Проницаемость клеточной стенки микроорганизма для антимикробных средств может быть повышена добавлением определенных веществ.

Например, проникновение олигонуклеотидов из культуральной среды в растущие клетки микобактерий может быть увеличено добавлением некоторых молекул, например, этамбутола или биотина [8–9]. А 19-мерные рибоолигонуклеотиды различной структуры, в том числе имеющие двуспиральные участки, достаточно легко проникают из культуральной среды в клетки *S. albicans* и ингибируют рост культуры [10]. Возможным объяснением показанного в нашей работе синергетического действия антибиотика и РНК может быть тот факт, что ципрофлоксацин лизирует клеточную стенку *Ps. aeruginosa* и способствует тем самым эффективному проникновению рибонуклеиновых кислот в бактерии.

При использовании НК в клеточных культурах и *in vivo* всегда возникает вопрос и о сохранности структуры нуклеиновой кислоты. Так, в работе [10] показано, что 19-мерные олигонуклеотиды не разрушаются в культуральной среде при культивировании *C. albicans* в течение 12 ч.

С другой стороны, в настоящее время получены новые варианты индукторов интерферона на основе дсРНК, обладающие повышенной устойчивостью к нуклеазам крови, пролонгированным действием на макрофагальную активность, сниженным уровнем токсичности по сравнению с Ридостином [1, 4]. Такие варианты также могут быть успешно использованы при создании терапевтических препаратов на основе дсРНК.

Изучение механизмов проникновения и воздействия рибонуклеиновых кислот на размножение *Ps. aeruginosa* в комбинации с антибиотиком является предметом нашего дальнейшего изучения.

Таким образом, в работе показано, что ципрофлоксацин в сочетании с препаратом НК оказывает более выраженное ингибирующее действие на рост культуры *Ps. aeruginosa* на плотной и жидкой питательной среде, чем один антибиотик в той же концентрации. Эти данные позволяют сделать вывод о том, что, используя комбинацию антибиотика и рибонуклеиновых кислот, можно снизить применяемые дозы ципрофлоксацина при лечении бактериальных инфекций у пациентов и тем самым уменьшить ряд побочных эффектов, связанных с применением антибиотика.

## Литература

1. Alikin Yu., Danilenko E., Levagina G., Masycheva V., Duchovskiy A., Prudnikov S., Shchelkunov I. Biological effects of the prolonged forms of interferon inducers at higher and lower vertebrates / Новые информационные технологии в медицине и экологии: 9-я междунар. конф. и дискус. науч. клуб, 1–10 июня 2001 г., Украина, Гурзуф... – Запорожье, 2001. – С. 173, К. 4.
2. Бондарь И.А., Масычева В.И. Индуктор интерферона ридостин в комплексной терапии сахарного диабета / Инновации в охране здоровья людей: Материалы науч.-практич. конф. 22–23 ноября 2001 г. Новосибирск, 2001. – С. 19–20.
3. Karpov O.V., Antonenko S.V., Barbasheva O.V. et al. Effect of interferonogenic molecular complex of yeast RNA – tilorone on DNA, RNA and protein synthesis *in vitro* // Ukr. Biochim. Zh. 2001. – Vol. 73. – N 2. – P. 33–38.
4. Levagina G.M., Masycheva V.I., Karpova S.F., Danilenko E.D., Fadina V.A., Alikin Ju.S. The technology for production of interferon inducers with a prolonged effect / Новые информационные технологии в медицине и экологии: 8-я междунар. конф. и дискус. науч. клуб, 1–10 июня 2000, Украина, Гурзуф. ... – Запорожье, 2000. – С. 93–94.
5. Лосева М.И., Масычева В.И., Букин В.Н., Бельцова А.И., Космачева Т.А., Садовская О.Б., Левагина Г.М., Усова С.В., Мишенин А.В., Крупна О.И. Ридостин в лечении и профилактике гриппа и ОРВИ / Инновации в охране здоровья людей: Материалы науч.-практич. конф. 22–23 ноября 2001 г. Новосибирск, 2001. – С. 115–116.
6. Масычева В.И., Черноусова Л.Н., Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Даниленко Е.Д., Фадинова В.А., Сизов А.А. Влияние препаратов дуспиральных РНК на функциональную активность макрофагов и жизнеспособность фагоцитированных микобактерий / Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: Материалы 11-й междунар. конференции и дискус. научн. клуб (Ялта, Гурзуф, Крым, 1–10 июня 2003 г.). – Запорожье, 2003. – С. 248–249 (К 6).
7. Чердынцева Н.В., Белявская В.А., Литвяков Н.В., Масычева В.И. Пероральное использование интерферона: терапевтический эффект и механизмы действия / Цитокины. Воспаление. Иммуитет: Материалы междунар. науч.-практич. школы-семинара. СПб, 23–26 июня 2002 г. – СПб., 2002. – Т. 1 – № 2. – С. 39–40.
8. Rapaport E., Levina A., Metelev V., Zamecnick P.C. Antimycobacterial activities of antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioates in drug-resistant strains // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – Vol.93. – P. 709–713.
9. Harth G., Zamecnick P.C., Jin-Yan Tang, Tabatadze D., Horwitz M. Treatment of Mycobacterium tuberculosis with antisense oligonucleotides to glutamine synthetase mRNA inhibits glutamine synthetase activity, formation of the poly-L-glutamate/glutamine cell wall structure, and bacterial replication // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – N 1. – P. 418–423.
10. Disney M.D., Haidaris C.G., Turner D.H. Uptake and antifungal activity of oligonucleotides in *Candida albicans* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol.100. – N 4. – P. 1530–1534.

## КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ В МОЛЕКУЛЯРНЫХ КОЛОНИЯХ

Т.Р. САМАТОВ, Е.В. ЧЕТВЕРИНА, А.Б. ЧЕТВЕРИН\*

*Институт белка РАН, Пушкино, Московская область*

### Клонирование генов *in vivo* и *in vitro*

Общепринятый метод клонирования генов включает в себя встраивание гена в векторную молекулу и трансформацию бактериальных клеток полученной генетической конструкцией (клонирование *in vivo*). При этом в одну клетку попадает и далее размножается не более одной рекомбинантной молекулы ДНК. В результате размножения в селективных условиях на твердой агаризованной среде (на чашке Петри) образуются колонии бактерий, представляющие собой потомство единичных клеток, то есть клоны. Помимо исследуемого гена, бактериальные клоны содержат компоненты самих клеток, что обуславливает необходимость последующей очистки интересующей исследователя ДНК с целью получения препарата, пригодного для анализа и дальнейших манипуляций. Использование живых клеток для клонирования генов имеет и другие недостатки. Так, продолжительность эксперимента определяется скоростью роста клеток и может составлять до нескольких суток. Кроме того, в процессе клонирования исследуемый ген неизбежно подвергается естественному отбору. И, наконец, одним из наиболее существенных ограничений является эффективность встраивания генов в вектор и собственно трансформации: в клетки проникает и затем дает начало индивидуальным клонам от 0,0001 до 0,01% исходного препарата ДНК (содержимого генной библиотеки) (Roberts & Ja, 1999).

К настоящему моменту описан ряд бесклеточных подходов, с использованием которых в принципе можно

получить индивидуальные клоны и которые лишены вышеперечисленных недостатков. Эти подходы основаны на той идее, что при истощающем разведении экспериментального образца в одном сортировочном компартменте окажется единичная молекула исследуемой генной библиотеки. В качестве компартментов могут выступать, например, реакционная ячейка (Lukyanov et al., 1996 [10]; Vogelstein & Kinzler, 1999 [22]), элемент микрочипа (Chetverin & Kramer, 1994) [4], микрошарик (Brenner et al., 2000) [3] или капля водно-масляной эмульсии (Tawfik & Griffiths, 1998 [21]; Dressman et al., 2003 [7]). В результате размножения ДНК с использованием бесклеточной системы, например, ПЦР, данный компартмент с некоторой долей вероятности будет содержать молекулярный клон. Однако сами разработчики этих методов вынуждены в каждом случае проверять чистоту полученных клонов при помощи обычного клонирования с использованием векторов и живых клеток.

### Функциональный скрининг генов *in vitro*

Важным компонентом бесклеточной биотехнологии является функциональный скрининг генных библиотек, то есть отбор из множества последовательностей именно тех, продуктами экспрессии которых являются белки с искомыми свойствами. В основе такого скрининга лежит технология бесклеточных генетических дисплеев. Их суть заключается в том, что в результате экспрессии генной библиотеки *in vitro* новосинтезированный белок оказывается связанным с кодирующей его молекулой нуклеиновой кислоты. Исследователь осуществляет селекцию ДНК или РНК по свойствам синтезированного продукта и вместе с этим продуктом автоматически выделяет соответствующий генотип.

Среди бесклеточных генетических дисплеев можно выделить несколько основных групп. В одной из них новосинтезированный полипептид оказывается связанным с кодирующей его мРНК. Связь может быть нековалент-

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Четверин Александр Борисович,  
д.б.н., член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией  
биохимии вирусных РНК Института белка РАН  
142290 Московская область, г. Пушкино, ул. Институтская, 4  
Тел.: (496) 773-2524  
Факс: (495) 632-7871  
E-mail: alexch@vega.protres.ru

тной, как в случае полисомного (Mattheakis et al., 1994) [11] и рибосомного (Hanes & Plueckthun, 1997) [9] дисплеев, либо ковалентной, как в мРНК-дисплее (Roberts & Szostak, 1997) [18], схожем с ним «in vitro вирусе» (Nemoto et al., 1997) [13] и при использовании «бифункциональной тРНК» (Merryman et al., 2002) [12].

Позднее были разработаны дисплеи, в которых синтезируемый белок связывается не с РНК, а с гораздо более стабильной ДНК. В результате при анализе отобранных последовательностей отпадает надобность в обратной транскрипции, которая малоэффективна и в процессе которой РНК-зависимой ДНК-полимеразой могут быть внесены мутации. Большинство этих подходов основано на так называемой «cis-активности» некоторых белков, то есть их способности связываться с определенными участками именно той молекулы ДНК, которая их кодирует. Здесь также возможно образование как нековалентного комплекса, например, при использовании белка RepA (Odegrip et al., 2004) [15], так и ковалентной связи в случае белков VirD2 (de Figueiredo et al., 2004) [8] и P2A (Reiersen et al., 2005) [17]. Существует метод, в котором за основу взяты микрошарики — сферы из полистирола диаметром около 1 мкм, покрытые стрептавидином. Со стрептавидином связываются биотинилированные молекулы ДНК геной библиотеки и биотинилированные антитела против специфических пептидов, последовательности которых присутствуют во всех новосинтезированных белках и благодаря которым эти белки оказываются присоединенными к данному микрошарику (Nord et al., 2003) [14].

В отдельную группу можно выделить метод, названный авторами «компартиментализация in vitro» и основанный на использовании водно-масляной эмульсии (Tawfik & Griffiths, 1998) [21]. В данном случае физическое разделение последовательностей, составляющих геновую библиотеку, происходит за счет ее истощающего разведения, в результате чего в большинстве капель оказывается не более одной молекулы ДНК. При экспрессии молекула ДНК и кодируемый ею белок оказываются в одной и той же капле, за счет чего и осуществляется связь генотипа и фенотипа. В некотором смысле эти компартменты — капли эмульсии — можно рассматривать как мини-клетки, в которых происходит экспрессия только одного гена.

Генетические дисплеи in vitro обладают всеми преимуществами, свойственными для бесклеточных методов, однако ни один из таких дисплеев не гарантирует, что в результате проведенной селекции будут получены истинные молекулярные клоны. Поэтому неизбежной

конечной стадией является обычное клонирование in vivo отобранных последовательностей, что обесценивает преимущества подходов in vitro.

### Метод молекулярных колоний

Истинные молекулярные клоны можно получить in vitro с помощью метода молекулярных колоний (Четверин и Четверина, 1998) [1], экспоненциально размножая нуклеиновые кислоты в тонком слое иммобилизованной среды (например, в пластинке геля). В результате, по аналогии с ростом бактерий на чашке Петри, в геле образуются колонии, каждая из которых представляет собой истинный клон, то есть потомство одной-единственной исходной молекулы. Ранее была продемонстрирована возможность клонировать таким образом молекулы РНК, размножая их с помощью Q $\beta$ -репликазы (Chetverina & Chetverin, 1993) [5], и показана точность и количественность этого метода, названного «методом молекулярных колоний». Разработка ПЦР-версии этого метода сделала возможным клонирование любого генетического материала в виде ДНК, при этом специфичность размножения ограничивается лишь используемыми олигонуклеотидными праймерами (Chetverina et al., 2002 [6]; Samatov et al., 2005 [19]).

Нами была разработана следующая схема выращивания и детекции колоний ДНК (рис. 1; Chetverina et al., 2002) [6]. ПЦР проводили в полиакриламидном геле, находящемся в лунке микроскопного предметного стекла. Новосинтезированную ДНК переносили на нейлоновую мембрану и выявляли колонии путем гибридизации с радиоактивно меченным зондом с последующей радиоавтографией.

Недавно нами была продемонстрирована возможность обнаружения молекулярных колоний путем гибридизации на фильтре с флуоресцентными зондами (Четверина и др., в печати), а также бесконтактного обнаружения молекулярных колоний ДНК непосредственно в геле с использованием «гомогенных» флуоресцентных систем детекции (Samatov et al., 2006) [20]. В результате процедура клонирования стала значительно быстрее, проще и дешевле.

Колония ДНК содержит до 108 молекул продукта ПЦР длиной свыше 1500 пар оснований, а число колоний пропорционально и близко к числу добавленных молекул матрицы (Samatov et al., 2005) [19]. Иными словами, в отличие от клонирования in vivo с использованием векторов и трансформации клеток, в виде колонии ДНК выявляется почти каждая исходная молекула гена. Таким



образом, разработанный подход позволяет исследователю избежать значительных потерь содержимого геной библиотеки.

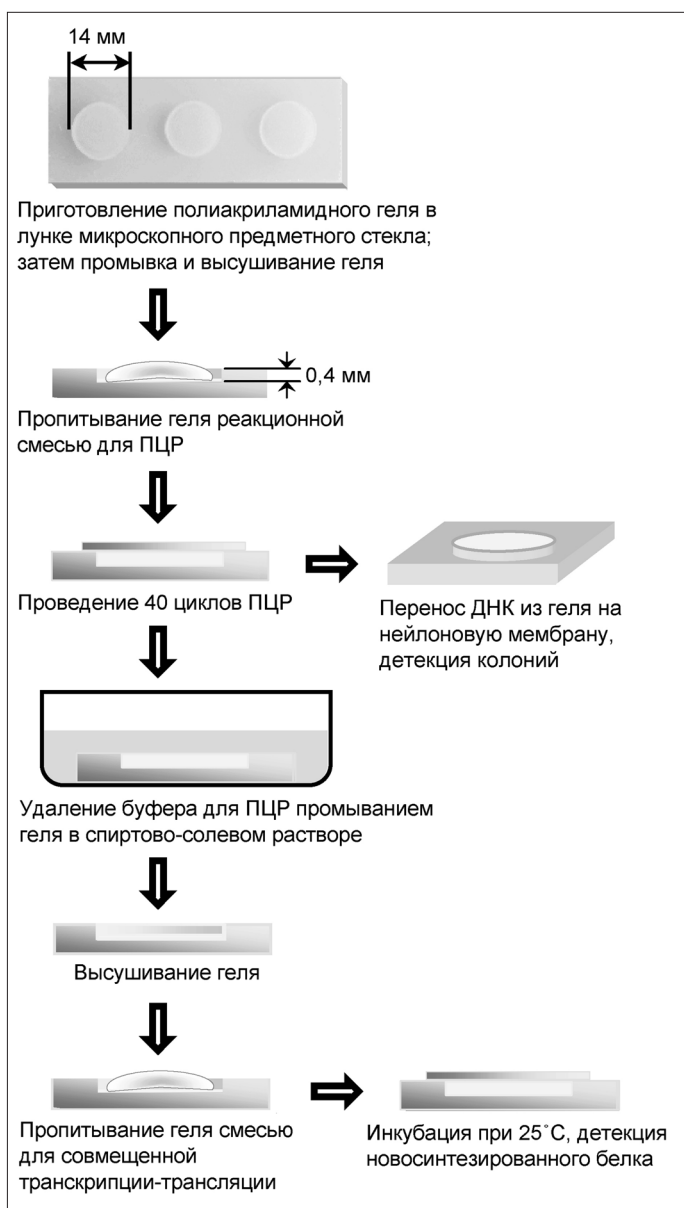


Рис. 1. Схема эксперимента по размножению и экспрессии генов в молекулярных колониях

### Экспрессия в молекулярных колониях: генетический дисплей

Синтез белка в молекулярной колонии и его детекция по функциональной активности означали создание первого бесклеточного метода клонирования генов, позволяющего проводить скрининг клонов по свойствам кодируемых продуктов экспрессии (Samatov et al., 2005) [19].

Экспериментальная схема клонирования и экспрессии генов в молекулярных колониях, реализованная на примере гена GFP, приведена на рисунке 1. После проведения ПЦР полиакриламидный гель промывают в спиртово-солевом растворе, затем в 50% этаноле и высушивают. В процессе этой обработки из геля вымываются низкомолекулярные вещества, а ДНК остается в виде компактных колоний. Данный способ можно использовать для того, чтобы в одном и том же геле последовательно проводить несколько реакций, оптимальные условия которых сильно различаются. В частности, таким образом нам удалось освободить гель от компонентов смеси для ПЦР, ингибирующих синтез белка.

Далее гель пропитывают бесклеточной системой транскрипции-трансляции. В указанной работе (Samatov et al., 2005) [19] использовали систему на основе пшеничного экстракта и гель инкубировали при 25 °С. В процессе инкубации детектировали флуоресценцию новосинтезированного GFP в геле с использованием лазерного сканера микрочипов.

Как можно видеть на рисунке 2, изображения гелей, полученные при детекции флуоресценции и при гибридизации колоний ДНК с радиоактивным зондом, практически совпадают. Это означает, что флуоресцируют молекулярные колонии, содержащие ген GFP, то есть экспрессия *in situ* привела к образованию функционально активного белка. Колонии содержат в среднем  $10^9$  молекул зрелого GFP ( $40 \text{ пг/мм}^2$ ), то есть около 10 молекул белка на молекулу матричной ДНК (Samatov et al., 2005) [19]. Такого количества белка достаточно для его обнаружения *in situ* по связыванию с антителами или лигандами, а также по его ферментативной активности.

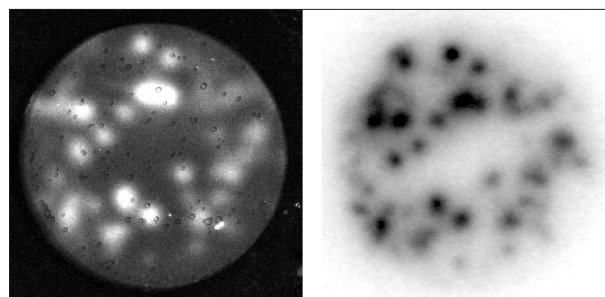


Рис. 2. Экспрессия гена GFP в молекулярных колониях. После ПЦР в геле провели транскрипцию-трансляцию. Регистрировали флуоресценцию GFP (слева), а затем в том же геле детектировали колонии ДНК, содержащие ген GFP (справа)



Разработанный метод позволяет осуществлять быстрый функциональный скрининг большого числа клонов одновременно. Благодаря отсутствию клеточных стенок, мембран, капель водно-масляной эмульсии и т.д. имеется прямой доступ к новосинтезированным белкам, что облегчает и ускоряет тестирование их функции. Кроме того, исследователь имеет возможность вводить в гель после экспрессии различные реагенты и, таким образом, тестировать специфическую активность клонов в условиях, отличных от условий транскрипции-трансляции.

Полученные результаты позволяют рассматривать разработанный метод как новую разновидность генетического дисплея, обладающую рядом существенных преимуществ перед используемыми в настоящее время подходами. В частности, физическая связь фенотипа и генотипа осуществляется за счет того, что ген и соответствующий ему белковый продукт находятся в одной и той же молекулярной колонии. Это позволяет обойтись без модификаций белка, обеспечивающих ковалентную связь с собственной матрицей либо образование с ней нековалентного комплекса, как у большинства бесклеточных генетических дисплеев. Таким образом, нативная структура белкового продукта клонов не нарушается.

Известно, что бесклеточные системы синтеза белка транслируют только каждую десятую молекулу мРНК, внесенную в реакционную смесь (Pavlov & Ehrenberg, 1996) [16]. Это означает, что в результате экспрессии библиотеки, в которой последовательности могут быть представлены всего в одном экземпляре, часть клонов неизбежно останется вне поля зрения исследователя. В то же время предлагаемый нами подход обеспечивает размножение каждой молекулы библиотеки в виде молекулярной колонии, которая содержит до 100 миллионов копий исходной матрицы. Следовательно, даже при малоэффективном вовлечении матриц в трансляцию экспрессирован будет каждый клон.

Более того, в результате экспрессии в молекулярной колонии оказывается до  $10^9$  молекул белкового продукта данного клона. Таким образом, белок имеет возможность формировать олиго- или даже мультимерные комплексы, если этого требует проявление его функциональной активности.

В заключение хотелось бы отметить, что в определенном смысле молекулярные колонии можно рассматривать как некие клетки, лишённые оболочек. Они представляют собой отдельные компартменты, где происходят биохимические процессы. Их геном представлен многими копиями одного гена, который они реплицируют и экспрессируют. Подобно живым организмам, они до-

бывают из окружающей среды энергию и материал для производства своих компонентов.

*Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума Российской академии наук «Молекулярная и клеточная биология».*

## Литература

1. Четверин А.Б. и Четверина Е.В. Способ клонирования нуклеиновых кислот. Патент РФ № 2 114 175 – 1998.
2. Четверина Е.В., Кравченко А.В., Фалалеева М.В., Четверин А.Б. Экспресс-гибридизация молекулярных колоний с флуоресцентными зондами (в печати – «Био-орган. химия»).
3. Brenner S., Williams S.R., Vermaas E.H., Storck T., Moon K., McCollum C., Mao J.-I., Luo S., Kirchner J.J., Eletr S., DuBridge R.B., Burcham T. and Albrecht G. In vitro cloning of complex mixtures of DNA on microbeads: physical separation of differentially expressed cDNAs // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 1665–1670.
4. Chetverin A.B. and Kramer F.R. Oligonucleotide arrays: new concepts and possibilities // Bio/Technology. – 1994. – Vol. 12. – P. 1093–1100.
5. Chetverina H.V. and Chetverin A.B. Cloning of RNA molecules in vitro // Nucleic Acids Res. – 1993. – Vol. 21. – P. 2349–2053.
6. Chetverina H.V., Samatov T.R., Ugarov V.I. and Chetverin A.B. Molecular colony diagnostics: detection and quantitation of viral nucleic acids by in-gel PCR // BioTechniques. – 2002. – Vol. 33. – P. 150–157.
7. Dressman D., Yan H., Traverso G., Kinzler K.W. and Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol. 100. – P. 8817–8822.
8. De Figueiredo P., Roberts R.L. and Nester E.W. DARTs: A DNA-based in vitro polypeptide display technology // Proteomics. – 2004. – Vol. 4. – P. 3128–3140.
9. Hanes J. and Pluckthun A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 1997. – Vol. 94. – P. 4937–4942.
10. Lukyanov K.A., Matz M.V., Bogdanova E.A., Gurskaya N.G. and Lukyanov S.A. Molecule by molecule PCR amplification of complex DNA mixtures for direct sequencing: an approach to in vitro cloning // Nucleic Acids Res. – 1996. – Vol. 24. – P. 2194–2195.
11. Mattheakis L.C., Bhatt R.R. and Dower W.J. An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 1994. – Vol. 91. – P. 9022–9026.

12. Merryman C., Weinstein E., Whuk S.F. and Bartel D.P. A bifunctional tRNA for in vitro selection // *Chem. Biol.* — 2002. — Vol. 9. — P. 741–746.
13. Nemoto N., Miyamoto-Sato E., Husimi Y. and Yanagawa H. In vitro virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro // *FEBS Lett.* — 1997. — Vol. 414. — P. 405–408.
14. Nord O., Uhlén M. and Nygren P.-Å. Microbead display of proteins by cell-free expression of anchored DNA // *J. Biotechnol.* — 2003. — Vol. 106. — P. 1–13.
15. Odegrip R., Coomber D., Eldridge B., Hederer R., Kuhlman, P.A., Ullman C., FitzGerald K. and McGregor D. CIS display: In vitro selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* — 2004. — Vol. 101. — P. 2806–2810.
16. Pavlov M.Y. and Ehrenberg M. Rate of translation of natural mRNAs in an optimized in vitro system // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1996. — Vol. 328. — P. 9–16.
17. Reiersen H., Lobersli I., Loset G.Å, Hvattum E., Simonsen B., Stacy J.E., McGregor D., FitzGerald K., Welschof M., Brekke O.H. and Marvik O.J. Covalent antibody display-an in vitro antibody-DNA library selection system // *Nucleic Acids Res.* — 2005. — Vol. 33. — E10.
18. Roberts R.W. and Szostak J.W. RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* — 1997. — Vol. 94. — P. 12297–12302.
19. Samatov T.R., Chetverina H.V. and Chetverin A.B. Expressible molecular colonies // *Nucleic Acids Res.* — 2005. — Vol. 33. — E145.
20. Samatov T.R., Chetverina H.V. and Chetverin A.B. Real-time monitoring of DNA colonies growing in a polyacrylamide gel // *Anal. Biochem.* — 2006. — Vol. 356. — P. 300–302.
21. Tawfik D.S. and Griffiths A.D. Man-made cell-like compartments for molecular evolution // *Nat. Biotechnol.* — 1998. — Vol. 16. — P. 652–656.
22. Vogelstein B. and Kinzler K.W. Digital PCR // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* — 1999. — Vol. 96. — P. 9236–9241.

## КОНЦЕПЦИЯ СОЗДАНИЯ МЕЖДУНАРОДНОЙ КОАЛИЦИОННОЙ ПРОГРАММЫ ПО БИОБЕЗОПАСНОСТИ

А.А. ВОРОБЬЕВ<sup>1</sup>, В.И. ЕВСТИГНЕЕВ<sup>2</sup>, Е.В. ПИМЕНОВ<sup>3</sup>, Р.Г. ВАСИЛОВ<sup>1\*</sup>, В.В. КУТЫРЕВ<sup>4</sup>

<sup>1</sup> *Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова,*

<sup>2</sup> *ОАО «Биопрепарат», Москва;*

<sup>3</sup> *Вятский государственный университет, Киров;*

<sup>4</sup> *Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

По заявлению государственных деятелей многих стран, в том числе Президента Российской Федерации В.В. Путина, на нашей планете началась третья мировая война. Она носит в основном террористический характер. При этом идеологи и непосредственные исполнители придают определенное значение биотерроризму, то есть применению в террористических целях биологических агентов (БА).

В качестве биологических агентов, поражающих людей, в принципе могут быть использованы:

1. Бактерии, вирусы, грибы, простейшие и их генетически измененные варианты.
2. Токсины микробов.
3. Токсины растений.
4. Переносчики возбудителей болезней.
5. Яды пресмыкающихся и членистоногих.
6. Поведенческие синтетические пептиды.

Однако по поражающему эффекту представители 2–6-й групп БА не имеют преимуществ перед другими современными способами массового поражения людей: химического, радиационного, огнестрельного оружия, взрывчатых веществ. Они могут быть использованы в основном для психологического воздействия на население, с целью устрашения. Значительно более опасную угрозу представляет применение в качестве поражающих агентов микробов. Даже специалисты-атомщики признают, что некоторые микробы в случае их приме-

нения могут вызвать массовые поражения населения, превосходящие по эффективности атомную бомбу. Эти БА наиболее опасны и могут применяться для массового уничтожения людей.

Действительно, если коснуться истории, то микробы вызывали опустошительные эпидемии. В средние века только чума и оспа уносили сотни миллионов жизней. В наше время от вирусных гепатитов за 15 лет погибло больше людей, чем во Вторую мировую войну. Ежегодно во всем мире от кори, малярии, туберкулеза, гепатита В умирает 2–3 млн. человек от каждой инфекции. Из 51 миллиона смертей от всевозможных болезней 16 миллионов приходится на инфекционные болезни.

В 30–60-е годы прошлого столетия высокая поражающая сила микробов была использована некоторыми странами для разработки нового, альтернативного атомному, оружия массового поражения людей. Когда стало ясно, что биологическое оружие таит угрозу человечеству, Генеральная ассамблея ООН в 1972 г. приняла конвенцию, запрещающую разработку, производство и применение биологического (токсинного) оружия. Однако эта конвенция подписана не всеми государствами и в любой момент может быть нарушена. Об этом свидетельствует «конвертная» война с применением спор возбудителей сибирской язвы в США в 2002 году.

Поэтому необходимо иметь надежную глобальную систему противодействия биологическому оружию. Эта система должна включать в себя решение и осуществление многих проблем: политических, экономических, организационных, специальных профилактических средств, обеспечивающих безопасность народов всех стран, поскольку биологическое оружие имеет свойство распространяться, преодолевая кордоны и границы.

\* **Автор для переписки:**

© 2006 г. Василев Раиф Гаянович,  
д.б.н., профессор, вице-президент Общества  
биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова  
119296 Москва, Университетский пр-т, 9  
Тел.: 8-916-640-76-18  
E-mail: obr@biorosinfo.ru

От каких же БА следует, прежде всего, создавать систему защиты?

На нашей планете «проживает» свыше миллиона видов бактерий,  $1,5 \cdot 10^6$  видов грибов, сотни тысяч видов вирусов и простейших (большинство из них пока не описано — >95%). Общая биомасса микробов, живущих на планете, превосходит биомассу всего остального мира живых существ.

Без микробов жизнь человека на планете была бы невозможна, так как они обеспечивают условия существования людей: определяют газовый состав атмосферы, плодородие почв, наличие полезных ископаемых (нефть, уголь, газ и др.), очистку планеты от накапливаемых продуктов жизнедеятельности человека, растений и животных. Подавляющее большинство микробов не представляет опасности для человека и только доли процента от существующих на планете видов микробов, примерно 3500 видов, могут вызывать болезни человека.

По степени опасности патогенные микробы широко варьируют. Поэтому систему защиты надо создавать, прежде всего от особо опасных бактерий и вирусов. Разработанная авторами критериально-рейтинговая оценка опасности и вероятности использования БА включает 10–15 видов возбудителей инфекционных болезней. Это — вирус натуральной оспы, возбудители чумы, сибирской язвы, туляремии, токсины ботулизма, возбудители сапа, мелиоидоза, геморрагической лихорадки, болезни Марбурга, сыпного тифа, Ку-лихорадки, гриппа, бруцеллеза, холеры. Конечно, следует предусматривать и возможность использования в качестве БА генетически модифицированные микроорганизмы и не только перечисленные выше, но и другие, которые в виде природных штаммов не представляют опасности. Примером может служить вирус атипичной пневмонии (SARS), происшедший из безобидного для человека коронавируса.

Генетическая модификация микробов возможна с целью: повышения вирулентности, изменения антигенности, что затрудняет идентификацию и диагноз; получения штаммов, вызывающих атипичные клинические проявления, усиление поражающего эффекта, неэффективность традиционных средств лечения; повышения устойчивости БА в окружающей среде; приобретения БА несвойственных путей передачи и др. Однако необходимо отметить, что генетически измененные штаммы микробов довольно нестабильны, а их получение является сложным наукоемким процессом.

Система специфического противодействия каждому из перечисленных БА должна включать в себя: наличие средств экспресс-индикации, экспресс-диагностики,

средств деконтаминации, дезинфекции, дератизации, дезинсекции, методов специфической и неспецифической профилактики, способов лечения, проведения и организации карантинных и других противоэпидемических мероприятий. Если проанализировать применительно к вышеназванным БА наличие комплекса перечисленных средств защиты, имеющихся на сегодняшний день, то выявятся большие «прорехи» в цельной системе противодействия наиболее опасным видам БА. Из таблицы 1 видно, что для защиты от вируса натуральной оспы отсутствуют средства лечения; от возбудителя чумы вакцина не удовлетворяет требованиям по эффективности; от сапа — отсутствует вакцинопрофилактика, требует также улучшения экспресс-диагностика; от вируса Марбурга — неэффективного лечения и вакцинации; от токсинов ботулизма — необходимо улучшение экспресс-диагностики и лечения; требуют совершенствования вакцины против сыпного тифа, Ку-лихорадки, гриппа, бруцеллеза, холеры.

Конечно, это узловые проблемы, которые надо решать, используя накопленные данные и научный потенциал, однако и другие проблемы не должны быть оставлены без внимания. Вполне понятно, что решить проблемы быстро и эффективно не под силу ни одной даже богатой стране (хотя в США в 2004 г. принят проект «Биоцит»). Поэтому требуется объединение усилий всех цивилизованных стран, с учетом их готовности и опыта по решению отдельных проблем в общей системе биобезопасности. Для этого необходимо создать международную коалиционную программу противодействия биотерроризму, которая обязывала бы отдельные страны, желающие в ней участвовать, разрабатывать нерешенные проблемы защиты от наиболее опасных БА.

Исходя из той информации, которой мы располагаем, целесообразно поручить разработку отдельных нерешенных проблем в общей системе защиты от БА следующим образом:

- по натуральной оспе — России, США;
- по чуме — Индии, Республике Корея, России;
- по сибирской язве — России, США;
- по токсинам ботулизма — России, США, Великобритании;
- по туляремии — США, Швеции, России;
- по сапу и мелиоидозу — США, России;
- по сыпному тифу и Ку-лихорадке — США, Чехии, Бразилии, России;
- по гриппу — России, США, Китаю, Франции;
- по бруцеллезу — Великобритании;
- по геморрагической лихорадке — ФРГ, ЮАР.

Таблица 1

**Состояние специальных средств защиты  
от наиболее опасных БА**

БА	Экспресс-индикация	Экспресс-диагностика	Деконтаминация	Спецпрофилактика	Лечение	Противоэпидемиологические мероприятия
Натуральная оспа	+	+	++	++	+++	++
Чума	++	++	++	++	+	++
Сибирская язва	++	++	+	+	++	++
Ботулизм	+	++	+	++	++	+
Сап, мелиоидоз	+	++	++	+++	+	+
Болезнь Марбурга	++	++	++	+++	+++	+
Сыпной тиф	+	++	++	+	++	++
Ку-лихорадка	+	+	+	++	+	+
Грипп	+	+	++	++	++	++
Бруцеллез	+	+	+	++	++	+
Туляремия	+	++	+	+	+	+

+ наличие средств, удовлетворяющих требованиям

++ наличие средств, не удовлетворяющих требованиям

+++ отсутствие средств

Безусловно, важно определить перечень стран, участвующих в коалиционной программе. Пока он указан сугубо ориентировочно и должен окончательно устанавливаться после проведенного комплекса политических, экономических, организационных и других форм решений и согласований на международном уровне.

Перечень таких решений представлен в таблице 2. В ней можно ясно видеть, какие проблемы и на каком уровне необходимо решить для создания международной коалиционной программы по биобезопасности, отвечающей современным требованиям.

Разработка международной коалиционной программы противодействия биотерроризму должна начаться как можно быстрее, иметь превентивный характер, не ожидая развязывания биотеррористических действий. К превентивному действию против террористов всех мастей призывает и Президент Российской Федерации В.В. Путин.

Первоочередные проблемы, которые надо решить, представлены в таблице 3. Они основаны на тщательном анализе существующей ситуации.

Решение научно-исследовательских, опытно-конструкторских, производственных и других задач, предусматриваемых указанной международной коалиционной программой, не будет затратным, так как повысит уровень противоэпидемической службы в целом, то есть не будет ненужным экономическим бременем для населения всех стран, — в отличие от огромных, подчас неоправданных затрат на вооруженные силы, предусмотренных в каждой стране.

Надеюсь, что поднятая нами проблема создания международной коалиционной программы противодействия биотерроризму, привлечет внимание руководства нашей страны и оно проявит приоритетную инициативу по созданию этой программы.



Актуальные задачи и потенциальные исполнители программы

Проблема	На каком уровне должно приниматься решение
Политические и дипломатические решения	Руководители государств, ООН
Создание рабочей группы по разработке программы	Всемирная организация здравоохранения
Экономическая база программы	Правительства стран-участниц
Гармонизация законодательной и нормативно-правовой базы, унификация средств защиты	Законодательные органы, министерства и ведомства стран-участниц
Обоснование приоритетов в рамках программы	— “ —
Структурно-функциональная схема взаимодействия	Разработчики программы
Подготовка высококвалифицированных кадров	Страны-участницы
Информационное обеспечение	Страны-участницы
Принципы создания международного банка средств противодействия биотерроризму	ВОЗ
Контроль над работами с особо опасными возбудителями	ВОЗ
Создание международных сил быстрого реагирования для работы в очагах инфекции	ВОЗ, правительства стран-участниц программы

Таблица 3

Первоочередные проблемы, которые нужно решить применительно к наиболее опасным БА

БА	Проблемы	
	Не решены	Требуют совершенствования
Натуральная оспа	Лечение	Вакцинация
Чума		Вакцинация
Сибирская язва		Вакцинация
Ботулизм	Экспресс-диагностика	Лечение
Туляремия		Экспресс-диагностика
Сап, мелиоидоз	Лечение	Экспресс-диагностика
Болезнь Марбурга		Экспресс-индикация
Сыпной тиф		Вакцинация
Ку-лихорадка		Вакцинация
Грипп	Лечение	Вакцинация
Бруцеллез	Лечение	Вакцинация
Холера		Вакцинация

Данная статья представляет собой доклад, сделанный А.А. Воробьевым на III съезде Общества биотехнологов России 27 октября 2005 г.

## ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ И ЗАЩИТА ОТ ПАТОГЕНОВ

Б.Ф. СЕМЕНОВ\*

*Российское научно-практическое общество эпидемиологов,  
микробиологов и паразитологов, Москва*

Согласно консолидированному мнению многих экспертов ВОЗ, России, США, в любой момент, в любой точке земного шара может возникнуть тяжелая эпидемия, возбудителем которой станет ранее неизвестный патоген. За последнюю треть истекшего столетия человечество столкнулось с рядом таких неизвестных патогенов.

В течение 1972–1981 гг. было идентифицировано 11 патогенов (в их числе вирус Эбола, вирус Ханта, *Legionella pneumoniae*); с 1982 по 1991 гг. было выявлено 13 патогенов, среди них ВИЧ — возбудитель СПИД, вирус гепатита Е; в 1992–2001 гг. — 13 патогенов, в том числе патогенные для человека прионы, вирус птичьего гриппа типа А (H5N1); в 2002–2004 гг. — 2 патогена: коронавирус — возбудитель тяжелого острого респираторного синдрома (атипичная пневмония) и вирус птичьего гриппа типа А (H7N7). Всего за период 1972–2004 гг. выделено и идентифицировано 39 новых патогенов.

Современные иммунологические методы борьбы с эпидемиями основаны на следующих представлениях. Вакцинация против известного патогена возможна, неизвестного — нет. Иммуноterapia при известном возбудителе проводится, при неизвестном — только в конце эпидемии. Проблема активации врожденного иммунитета в отношении известного патогена обсуждается, неизвестного — разрабатывается.

Среди указанных методологических подходов в последнее время привлекает внимание и интенсивно разрабатывается вопрос о механизмах активации врожденного иммунитета (ВИ). Последний характеризуется следующими особенностями:

- Это древняя система распознавания и защиты от чужого. Выявлена у растений, беспозвоночных и у всех позвоночных (от мыши до человека).
- Она распознает с помощью генетически закодированных рецепторов консервативные, присутствующие только микроорганизмам, молекулярные структуры (pathogen associated molecular patterns — PAMPs).
- После распознавания PAMPs начинается выполнение эффекторных функций ВИ. Это происходит без пролиферации клеток-эффекторов, поэтому защита формируется быстро (часы).
- Активация ВИ является первым и обязательным этапом развития адаптивного иммунитета

Эффекторная система врожденного иммунитета включает в себя кожу и слизистые, гуморальные факторы (комплемент, лизоцим, растворимые рецепторы для патогенов — С-реактивный белок, сурфактанты и т.д.), фагоцитирующие клетки (дендритные, макрофаги, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы), клетки-продуценты воспалительных медиаторов (базофилы, тучные клетки), естественные киллеры, В-1 лимфоциты, Т гамма дельта. Сейчас разрабатывается концепция экстренной защиты от патогенов (в течение нескольких часов), которая основана на предположении о том, что стимуляция созревания дендритных клеток с помощью носителя PAMPs (иммуномодуляторов бактериального происхождения) приведет к активации эффекторных механизмов врожденного иммунитета (24 часа) и формированию протективного иммунитета против конкретного патогена (7–14 дней).

Ведущими факторами при этом являются рецепторные структуры. В таблице 1 приведены рецепторы врожденного иммунитета, распознающие патоген-ассоциированные структуры микроорганизмов.

К настоящему времени получены довольно подробные данные о TOLL-подобных рецепторах и их лигандах (табл. 2).

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Семенов Борис Федорович,  
академик РАМН, председатель Российского  
научно-практического общества эпидемиологов,  
микробиологов и паразитологов  
105064 Москва, Малый Казенный пер., 5а  
Тел.: (495) 917-49-00

Таблица 1

**Рецепторы врожденного иммунитета,  
распознающие патоген-ассоциированные структуры микроорганизмов**

<b>Рецепторы</b>	<b>Экспрессированы</b>
Toll-подобные	На мембранах МФ, ДК, моноцитов, тучных клеток, нейтрофилов и т.д.
NOD	В цитоплазме
Маннозные	На мембранах МФ, ДК, соматических клеток и т.д.
Мусорщики	На мембранах, МФ, ДК и т.д.
Активация NK	На мембранах NK, МФ

Таблица 2

**TOLL-подобные рецепторы (TLRs) и их лиганды (PAMPs)**

<b>TLRs</b>	<b>PAMPs</b>	<b>Носитель</b>
TLR 1 / TLR 2	Липопротеин	грам <sup>+</sup> , грам <sup>-</sup> бактерии
TLR 2	Липопротеин	грам <sup>+</sup> , грам <sup>-</sup> бактерии
	Липотейхоевая кислота	грам <sup>+</sup> , грам <sup>-</sup> бактерии
	Зимозан	дрожжи
	Липоарабиманнан	M. tuberculosis
	Фосфолипиды	трипаносомы
TLR 3	ds RNK	вирусы
TLR 4	ЛПС	грам <sup>-</sup> бактерии
TLR 5	Флагеллин	грам <sup>+</sup> , грам <sup>-</sup> бактерии
TLR 6	Липопептиды	грам <sup>+</sup> , грам <sup>-</sup> бактерии
TLR 7	ss RNK	вирусы
TLR 8	???	
TLR 9	ss RNK	вирусы
	YCpY - DNK	бактерии
TLR 10–13	???	

Особое место в системе врожденного иммунитета принадлежит дендритным клеткам, которые, по мнению ряда авторов, являются ее ключевым элементом.

К наиболее важным функциям дендритных клеток относятся:

- Они распознают патоген-ассоциированные молекулярные структуры (ПАМС) микроорганизмов.
- После распознавания ПАМС начинается экспрессия: костимулирующих молекул (CD40, CD80,

CD86); молекул антигенного представления (МНСI, МНСII); секреция цитокинов.

- Передают сигнал активации нативным Т-лимфоцитам (формирование приобретенного иммунитета).
- Определяют развитие иммунного ответа по Th1 и Th2 типу.

Ведется активный поиск эффективных средств против различных патогенов. Так, например, осуществлено исследование влияния рекомбинантных интерлейкинов на развитие экспериментальных инфекций (табл. 3).

Таблица 3

**Влияние рекомбинантных интерлейкинов  
на развитие экспериментальной инфекции**

Патоген	IL-1	TNF $\alpha$	IFN $\gamma$	IL-12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	✓	✓	✓	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	✓	✓	✓	✓
<i>Salmonella typhimurium</i>	✓	✓	✓	✓
<i>Escherichia coli</i>	✓	✓	✓	
<i>Staphylococcus aureus</i>	✓	✓	✓	✓
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	✓			✓
<i>Streptococcus suis</i>	✓			
<i>Listeria monocytogenes</i>	✓	✓	✓	✓
<i>Candida albicans</i>	✓		✓	✓
<i>Legionella pneumophila</i>		✓	✓	
<i>Mycobacterium spp</i>		✓	✓	✓
<i>Chlamydia trachomatis</i>		✓	✓	
<i>Chlamydia psittaci</i>				✓
<i>Aspergillus fumigatus</i>		✓	✓	
<i>Brucella abortus</i>			✓	✓
<i>Yersinia enterocolitica</i>			✓	✓
<i>Cryptococcus neoformans</i>			✓	✓

Таблица 4

**Предполагаемый набор распознающих рецепторов (PRPs),  
с которыми могут реагировать PAMPs антигенных комплексов  
поликомпонентной вакцины «Иммуновак ВП-4»**

PAMPs	Рецепторы PAMPs
Липопептиды	TLR 1, TLR 6
Липоротейны	TLR 2
Липотейхоевые кислоты	TLR 2
ЛПС	TLR 4, TLR 2 *
CpG-DNA	TLR 7, TLR 8
Пептидогликан	NOD 2 **

\* *Leptospira interrogans*

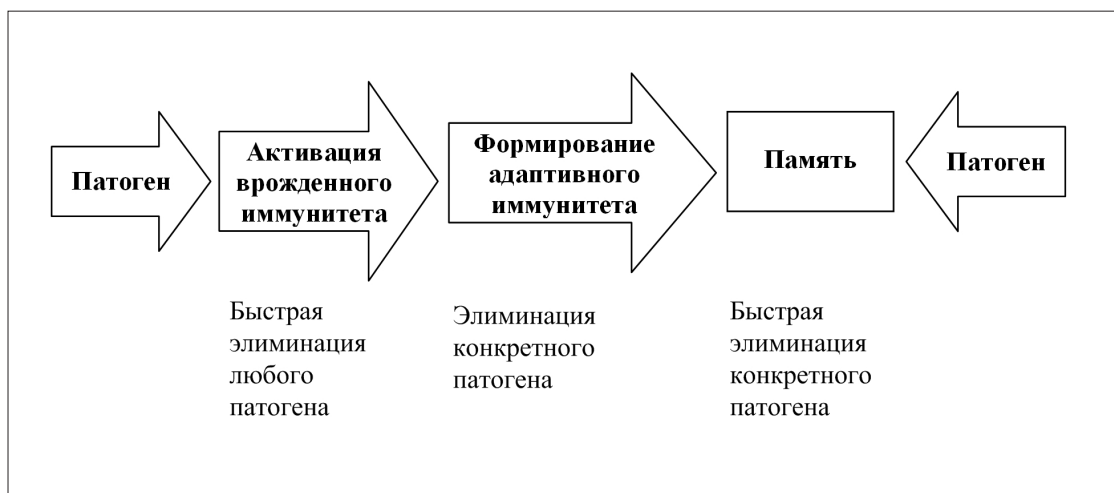
\*\* Внутриклеточный рецептор, распознает мурамилдипептид стенки практически всех бактерий

Из данных, приведенных в таблице 3, можно заключить, что IL-1 предупреждает развитие 9 инфекций, TNF $\alpha$  (альфа) – 10, IFN $\gamma$  (гамма) – 14, IL-12 – 11. Суммарно четыре интерлейкина защищают от 17 патогенов.

В Институте вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова Российской академии медицинских наук разработана поликомпонентная вакцина «Иммуовак ВП-4», которая состоит из антигенных комплексов *S. aureus*,

*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*. Определен предполагаемый набор распознающих рецепторов (PRPs), с которыми могут реагировать патоген-ассоциированные молекулярные структуры (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) антигенных комплексов этой вакцины (табл. 4).

В целом последовательность разворачивания системы иммунологической защиты от патогенов представлена на нижеследующей обобщенной схеме.



Безусловно, в обсужденной проблеме многие теоретические и методологические аспекты еще требуют тщательной разработки, однако жизнь в лице новых патогенов ставит конкретные практические задачи, которые требуется незамедлительно решать. Нам представляется, что доктрина активации врожденного иммунитета позволяет делать положительные шаги в данном направлении.

*Материалы доклада, сделанного 1 июня 2006 года в Санкт-Петербурге на Научно-практической конференции «Актуальные проблемы биобезопасности», посвященной памяти академика РАМН А.А. Воробьева.*



## ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА: ПРОШЛОЕ, НАСТОЯЩЕЕ, БУДУЩЕЕ

В.В. ЗВЕРЕВ\*

*НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва*

В настоящее время в мире существует более 100 различных вакцин, которые защищают от более чем сорока различных инфекций вызываемых бактериями, вирусами, простейшими [2].

До середины 80-х годов прошлого столетия все вакцинные препараты, которые были разработаны, базировались на трех основных методологических подходах:

1. Живые вакцины — препараты, в которых действующим началом являются ослабленные тем или иным способом патогенные микроорганизмы, потерявшие способность вызывать заболевание, но сохранившие способность вызывать иммунный ответ на возбудитель. Примером таких вакцин являются вакцины против кори, краснухи, полиомиелита, эпидемического паротита, гриппа и др. Кроме того, как было в случае натуральной оспы, иногда используются микроорганизмы близкие по своей структуре к возбудителю инфекционного заболевания людей.

2. Инактивированные (убитые) вакцины, которые включают в себя убитые тем или иным способом патогенные для человека микроорганизмы или их фрагменты. На таком подходе созданы вакцины против гриппа, клещевого энцефалита, бешенства, брюшного тифа.

3. Анатоксины (токсоиды), содержащие бактериальные токсины в измененной нетоксичной форме, способные вызывать защитный эффект организма. Примером таких вакцин являются хорошо известные и широко применяемые вакцины против дифтерии, столбняка, коклюша.

С середины 80-х годов прошлого столетия с началом бурного развития молекулярной биологии, генетики и

методов генной инженерии появился новый класс вакцин — молекулярные вакцины, в которых используются рекомбинантные белки или фрагменты белков патогенных микроорганизмов искусственно синтезированные в клетках лабораторных штаммов бактерий, вирусов, дрожжей. В практику пока вошли только три таких препарата: рекомбинантная вакцина против гепатита В, предложенная несколькими компаниями (1986, 1989); рекомбинантная вакцина против болезни Лайма (1998) и детоксицированный коклюшный токсин, который включен в состав АКДС-вакцины, применяемой в Италии.

Применение всех этих вакцинных препаратов позволило человечеству достичь невероятных результатов в борьбе с инфекционными заболеваниями. Так, в мире полностью ликвидирована натуральная оспа, заболевание, ежегодно уносившее миллионы человек. Практически ликвидирован на большинстве континентов полиомиелит. Продолжается глобальная ликвидация кори. В сотни и даже тысячи раз снижена заболеваемость дифтерией, краснухой, коклюшем, эпидемическим паротитом, вирусным гепатитом В и целым рядом других опасных инфекционных заболеваний. И все это благодаря вакцинам.

Однако несмотря на все достигнутые успехи, в современном мире инфекционные болезни до сих пор остаются одной из главных причин смертности: на их долю приходится до 30% ежегодно регистрируемых летальных исходов на планете, что составляет 14–17 млн. случаев [3, 4].

Согласно прогнозу экспертов ВОЗ, России и США, в первой половине XXI века в любое время, в любой точке земного шара следует ожидать возникновение эпидемии или вспышки инфекций, возбудителями которых могут быть новые или возвращающиеся инфекционные заболевания [5, 6, 7, 8].

Источником новых возбудителей инфекционных заболеваний являются природные очаги, из которых в человеческую популяцию практически ежегодно заносятся неизвестные микроорганизмы. В течение последних 30

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Зверев Виталий Васильевич,  
академик РАМН, директор НИИ вакцин и сывороток  
им. И.И. Мечникова РАМН  
105064 Москва, Малый Казенный пер., 5а  
Тел.: (495) 917-49-00

лет человечество столкнулось с 40 новыми патогенными для человека микроорганизмами, которые в ряде случаев стали реальной угрозой для жизни и здоровья сотен тысяч людей. Среди вновь обнаруженных возбудителей вирусы, бактерии, и прионы. Существует твердое убеждение, что занос из природы неизвестных до сих пор микроорганизмов будет происходить и в дальнейшем [5, 6, 7].

Возвращение управляемых с помощью вакцинации инфекций происходит в тех случаях, когда на фоне эпидемиологического благополучия прекращаются прививки, предусмотренные национальным календарем, или уменьшается охват прививками контингентов риска. Этот феномен в современной литературе описывается понятием «вакцинозависимость человеческого сообщества».

Возвращение управляемых детских инфекций в последние десятилетия наблюдали в Японии, России, Азербайджане, Грузии, Таджикистане, Украине, на Гаити, в Венесуэле и Колумбии, где были зарегистрированы эпидемии коклюша, дифтерии, полиомиелита и кори.

Появление известных патогенных для человека микроорганизмов на новых территориях описывали неоднократно. Так, в 1942–1945 гг. на территории Японии зарегистрировали, по меньшей мере, 200 000 случаев лихорадки Денге, а во Вьетнаме в июле-сентябре 1960 г. возникла эпидемия этой лихорадки, жертвами которой стали 2 млн. человек [9]. В 1999 г. в Нью-Йорке зарегистрировали случаи лихорадки Западного Нила. К 2002 г. это заболевание наблюдали на территории 44 штатов [7]. По неполным данным, к концу 2002 г. было известно о 4156 случаях лихорадки Западный Нил, из которых 284 завершились летальным исходом. В мае 2003 г. появились сообщения о заболеваниях в США, ассоциированных с вирусом оспы обезьян. Зарегистрировали около 50 случаев. Вспышка не получила распространения, так как вирус не передавался от человека к человеку.

Занос известных микроорганизмов на новые территории связывают с миграцией людей (Денге), переносчиков (Денге, Западный Нил) или перемещением экзотических животных, приобретаемых для домашних или общественных зоопарков (Западный Нил, оспа обезьян) [7, 9].

В последние годы стало общепризнанным, что для построения эффективной системы защиты от новых и возвращающихся инфекций необходимо создание глобальной системы мониторинга инфекционной заболеваемости и мониторинга свойств, значимых для медицины микроорганизмов. Такой мониторинг позволил достаточно быстро выявить первые случаи тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС — русский

эквивалент английского SARS), вызываемого новым вариантом коронавируса.

Материалы мониторинга используются для подготовки прогнозов, в которых называют ожидаемые в ближайшем или отдаленном времени вероятные возбудители эпидемии или вспышки.

На основании представленного прогноза и опыта его реализации в практике представляется возможным сделать ряд выводов о перспективах иммунопрофилактики ожидаемых инфекций, имея в виду использование существующих и создание новых вакцин.

Кроме того, в последнее время важность усовершенствования старых и разработки новых вакцинных препаратов обусловлена предпосылкой их более широкого и масштабного применения в тех областях медицины, в которых вакцины ранее не использовались.

К сожалению, далеко не всегда старые испытанные технологии получения вакцинных препаратов позволяют создавать вакцины против новых инфекций. В некоторых случаях они оказываются неэффективными или опасными для применения. Как уже говорилось выше, большие надежды возлагались на вакцины, полученные на основе рекомбинантных антигенов. В настоящее время стало очевидным, что в большинстве случаев с помощью рекомбинантных технологий получают препараты, обладающие слабой иммуногенностью. Современная иммунология объясняет слабую иммуногенность продуктов, получаемых с помощью рекомбинантных технологий, тем, что они лишены ассоциированных с микроорганизмом молекулярных структур, распознавание которых необходимо для запуска ответа сначала врожденного иммунитета, а затем развития адаптивного иммунного ответа.

Прогнозируется, что рекомбинантные вакцины получат широкое применение в практике только тогда, когда будут лицензированы для применения на людях новые адъюванты (усилители), потенцирующие антигенную активность этих вакцин.

За последние 10 лет в вакцинологии сформировалось новое направление, основанное на принципе, когда в организм вводится не белок, а нуклеиновая кислота (ДНК или РНК). Данное направление называют «генетической иммунизацией», «вакцинацией нуклеиновыми кислотами», «ДНК-вакцинацией» и связывают с этим направлением революционные изменения в вакцинологии ближайшего будущего. Несмотря на то, что способность ДНК и РНК инициировать синтез кодируемых ими белков после проникновения в клетку известна давно, только в середине 90-х годов прошлого века были осознаны и сформулированы возможности этой технологии

применительно к медицине, ветеринарии и фундаментальной науке. Такой новый подход достаточно прост, дешев и самое главное дает возможность унифицировать методы. После разработки относительно безопасных векторных систем, повышения эффективности доставки нуклеиновых кислот в ткани и обнаружения возможности длительной (до года) экспрессии чужеродной ДНК в трансформированных клетках *in vivo* стал ясен потенциал указанной технологии в генотерапии и создании вакцинных препаратов. В 1993 г. было показано, что ДНК-вакцинация приводит к полноценному иммунному ответу, то есть к образованию антител (гуморальный ответ) и цитотоксических Т-лимфоцитов (клеточный ответ), и обеспечивает у животных высокий уровень защиты от вирусной инфекции.

Экспериментальная работа по конструированию ДНК-вакцины ведется очень активно, особенно в области конструирования вирусных систем. С января 2000 г. по март 2003 г. опубликованы результаты исследования на мышцах 139 конструкций, созданных на основе 18 вирусов, включая ВИЧ-1 и ВИЧ-2, дельта вирус, вирусы гриппа, кори, гепатита С и т.д.

В рамках указанных исследований изучали разные ДНК-системы, возможность повышения их эффективности за счет использования новых адъювантов и применения для ревакцинации генно-инженерной вакцины другого типа. Для ревакцинации, которая проводится после первичного применения ДНК-вакцины, предлагают использовать или рекомбинантный белок или рекомбинантный вирусный вектор.

Интерес к ДНК-вакцинам стимулирует и ряд перспективных свойств, которыми они обладают. Используя один и тот же плазмидный или вирусный вектор, можно создавать вакцины, против различных инфекционных заболеваний, меняя только последовательность, кодирующую необходимые антигены. При этом отпадает необходимость манипулирования с патогенными вирусами и бактериями. Отпадает сложная и дорогостоящая процедура очистки антигенов. Важно также то, что препараты ДНК-вакцин не требуют специальных методов доставки и стабильны длительное время при комнатной температуре. ДНК-вакцины содержат структуры, распознаваемые системой врожденного иммунитета как чужие. Поэтому от них ожидают высокую иммунологическую эффективность.

В настоящее время разработаны и испытываются ДНК-вакцины против инфекций вызываемых вирусами гепатитов В и С, вирусом гриппа, вирусом лимфоцитарного хориоменингита, вирусом бешенства, вирусом

иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусом японского энцефалита, а также возбудителями сальмонеллеза, туберкулеза и некоторых паразитарных заболеваний (лейшманиоз, малярия). Выбор инфекций связан не только с их высокой актуальностью для человечества, но и с безуспешными попытками создать надежные вакцинные препараты классическими, широко используемыми в настоящее время методами.

ДНК-вакцинация представляется одним из самых перспективных направлений в борьбе с раком. Разработаны следующие методологические подходы к вакцинотерапии различных опухолей при помощи различных рекомбинантных ДНК:

1. Введение в организм (опухоль) ДНК, кодирующих раковые антигены.
2. Активация антиген представляющих клеток.
3. Введение в раковые клетки генов цитокинов и иммуномодуляторов.
4. Комбинированные подходы, которые заключается в одновременном использовании векторных систем, кодирующих раковые антигены, гены «убийства» клетки и цитокины.

Однако прежде чем ДНК-вакцинация войдет в медицинскую практику, следует решить целый ряд вопросов, связанных с безопасностью введения таких препаратов в организм человека, изучить длительность индуцируемого ими иммунитета и последствия для иммунной системы нового способа представления антигена. Поэтому, для того чтобы этот метод получил широкое применение, необходимо решить целый ряд принципиальных научных вопросов.

Безуспешные попытки создания новых вакцинных препаратов против некоторых инфекционных заболеваний, таких как ВИЧ-инфекция, гепатит С, малярия, стрептококковая инфекция, а также бурное развитие в последнее десятилетие геномики, биоинформатики и протеомики привели к возникновению совершенно нового подхода к созданию вакцин, получившего название «обратная вакцинология» («reverse vaccinology»).

Предложенный термин «обратная вакцинология» четко выражает суть нового технологического приема. Если раньше при создании кандидатов в вакцинные препараты шли по нисходящей от целого микроорганизма к его составляющим, то теперь предлагается противоположный путь — от генома к его продуктам. Такой подход основан на том, что большинство защитных антигенов являются белковыми молекулами. Поэтому полные знания обо всех белковых компонентах любого возбудителя заболевания могут позволить определить

те из них, которые являются потенциальными кандидатами на включение в состав вакцинного препарата. До недавнего времени разработка вакцин на базе данных о полной структуре геномов и белков была невозможна из-за недостаточного количества знаний и отсутствия некоторых технологий. Однако геномная и постгеномная революция резко изменила ситуацию. Определение нуклеотидной последовательности полного генома возбудителей инфекционных заболеваний — в настоящее время вопрос если не нескольких дней, то нескольких недель. Причем, предварительная работа по получению библиотек клонов ДНК возбудителя уже давно проводится с помощью стандартных коммерческих наборов ферментов. Современные приборы для автоматического определения нуклеотидной последовательности позволяют проводить в год до 14 000 000 реакций. Таким образом, за период с 1997 по 2003 г. определена полная нуклеотидная последовательность 78 микроорганизмов [1]. Полная компьютерная сборка генома и его описание с полным списком кодируемых белков при помощи компьютерных программ занимает в настоящее время несколько месяцев. В результате этого анализа исследователь имеет не только список возможных кодируемых белков, но и некоторые их характеристики. Такие, например, как принадлежность к определенным группам на основе предполагаемых их функций, возможная локализация внутри бактериальной клетки, секреторная способность, связь с мембраной, антигенные свойства. Поэтому такой компьютерный анализ («in silico») определяет первую важную стратегию по отбору возможных кандидатов в вакцинный препарат [1].

Другим важнейшим критерием для отбора антигенов является анализ транскрипционной активности отдельных генов микроорганизмов, используя изучение микростроения ДНК. Цель этой технологии одновременное измерение уровней синтеза мРНК всех продуктов генов, экспрессирующихся в живой клетке. Для этих целей используется целый ряд методов, суть которых заключается в том, что на нейтральных носителях с помощью специально синтезированных фрагментов ДНК исследуются все возможные рамки считывания исследуемого микроорганизма. Разработаны и специальные компьютерные программы, позволяющие рисовать транскрипционные профили всех изучаемых генов. Эта технология дает полную картину транскрипционной активности возбудителя заболевания и позволяет провести сравнительную характеристику экспрессии генов в различных условиях роста и определить гены, специфически регулируемые во время инфекции. Очень часто

продукты таких генов представляют наибольший интерес для создания вакцинных препаратов.

Третий подход к отбору кандидатов в вакцины базируется на протеомной технологии, методы которой позволяют в значительной мере детализировать количественную и качественную характеристику белков в различных клеточных компонентах микроорганизма. В настоящее время разработан целый ряд методов выделения, очистки и исследования белковых молекул. В протеомике используются практически все известные методы количественного и качественного анализа белков, начиная с обычного и двумерного электрофореза, хроматографии, которые могут дать только предварительные характеристики молекулярной массы и количества белка в клетке. Однако полный переворот в протеомике произвел метод масспектрографии и его различные модификации. С помощью этого метода можно сейчас дать полную количественную и качественную характеристику белковых продуктов, определить принадлежность белка к той или иной группе, указать его локализацию в клетке. Кроме того, существуют компьютерные программы, которые, используя базы данных об известных и хорошо изученных белках, могут по аминокислотной последовательности предсказать не только трехмерную структуру изучаемого белка, но и его свойства и функции.

Используя эти три стратегии, можно отобрать тот пул генов (белков), которые представляют определенный интерес для создания вакцинного препарата. Как правило, этот пул включает около 20–30% всех генов (белков) бактериального генома.

Эта отобранная группа нуждается в дальнейшей проверке на возможность вызывать защитный ответ в организме. Для этого необходимо синтезировать отобранный антиген в различных системах и очистить его в необходимых для иммунизации животных количествах. Уже разработан целый ряд векторных систем и методов для клонирования и экспрессии клонированного гена в бактериальных и эукариотических клетках, которые позволяют нарабатывать белок в любых количествах. Для очистки необходимого белка в настоящее время используются специальные полностью автоматизированные приборы, которые позволяют выделить и очистить большое количество исследуемых белков в количествах, достаточных для иммунизации. Так, например, используя эти технологии, лаборатория, состоящая из трех исследователей, может в течение месяца выделить и очистить более 100 различных исследуемых белков.

Впервые этот подход был использован для создания вакцины против менингококков группы В.



В результате работы была создана комбинация антигенов, способных защищать от инфекции, и разработан вакцинный препарат.

Используя описанный подход, создали вакцинные препараты против инфекций, вызываемых *Streptococcus agalactiae* (2002), *Staphylococcus aureus* (2002), *Streptococcus pneumoniae* (2001), *Porphyromonas gingivalis* (2001), *Chlamydia pneumoniae* (2002) и *Plasmodium falciparum* (2000) [1].

Интенсивные работы проводятся не только по разработке современных вакцинных препаратов, но и по способу их введения в организм, усилению их действия. Разрабатываются новые адъюванты и системы доставки защитных антигенов. Все большее внимание специалистов работающих в этих областях привлекают так называемые «мукозальные» вакцины, которые вводятся не инъекционно, а местно на слизистые (пероральные, назальные) или чрезкожно. Такой способ введения вакцинного препарата через входные ворота инфекции стимулирует помимо общего еще и местный иммунитет и представляется весьма перспективным.

Международные эксперты и правительства большинства стран ныне рассматривают вакцинопрофилактику как наиболее доступный и экономически эффективный способ снижения детской смертности, увеличения ожидаемой продолжительности жизни и достижения активного долголетия во всех социальных группах развитых и развивающихся стран.

В 1998 году в России принят Федеральный закон «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней», в котором устанавливаются правовые основы государственной политики в области иммунопрофилактики инфекционных болезней, осуществляемой в целях охраны здоровья и обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации.

В ближайшее десятилетие будет существенно расширена сфера применения вакцин. Это расширение произойдет в нескольких направлениях:

1. За счет сохранения и расширения прививок в рамках национальных календарей.

2. Создания вакцин для предупреждения новых и возвращающихся инфекций, а также для защиты от бактериологических актов.

3. Разработки препаратов для иммунопрофилактики и иммунотерапии онкологических заболеваний.

4. Создания средств для иммунологической защиты и лечения наркозависимости и курения.

5. Конструирования вакцин, предупреждающих и нормализующих болезни иммунной системы (аллергия, аутоиммунные процессы).

6. Увеличения удельного веса терапевтических вакцин, применяемых в рамках комплексного лечения хронических болезней разной этиологии.

7. Применения вакцин для профилактики соматических заболеваний (инсулинозависимый диабет, миокардит, атеросклероз, инфаркт и т.д.).

Для решения перечисленных задач будут использоваться достижения геномики и протеомики с учетом новых идей иммунологии, связанных с признанием ведущей роли системы врожденного иммунитета в создании защиты от возбудителя.

## Литература

1. *Genomics, proteomics and vaccines* / Ed. G. Grandi. — John Wiley & Sons, Ltd, England, 2004. — 313 p.
2. Таточенко В.К., Озерцовский Н.А., Соколова А.Ф., Алексина С.Г., Федоров А.М. Иммунопрофилактика — 2000. — М.: Изд-во «Остоженка-Инвест», 2000.
3. *World Health Report 1996: Fighting disease, fostering development*. — Geneva, 1996.
4. *World Health Report 2002: Reducing risks, promoting healthy life*. — Geneva, 2002.
5. Покровский В.И., Онищенко Г.Г., Черкасский Б.Л. Эволюция инфекционных болезней в России в XXI веке. — М.: ГЭОТАР-Мед, 2003. — 664 с.
6. Сергеев В.П., Малышев Н.А., Дрынов И.Д. Инфекционные болезни и цивилизация. Прошлое, настоящее, будущее. — М., 2000. — 207 с.
7. *Microbial threats to health: emergence, detection, and response* / M.S. Smolinski, M.A. Hamburg, J. Lederberg (eds). — Washington, The National Academies Press, 2003. — 398 p.
8. Lederberg J. Infectious diseases as an evolutionary paradigm // *Emerg. Infect. Dis.* — 1997. — Vol. 3. — N 4. — P. 417–423.
9. Hotta S. Dengue and related hemorrhagic diseases — St. Louis, Missouri: Warren H. Green, Inc., 1969. — 166 p.



## К 50-ЛЕТИЮ ВАЖНОЙ ВЕХИ В РАЗВИТИИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ – ОТКРЫТИЯ АРТУРОМ КОРНБЕРГОМ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ

В.С. Воробьев \*, О.В. Воробьева

*Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Москва*



Есть даты в истории науки, мимо которых нельзя проходить равнодушно, и уж если имеется какой-либо формальный повод для повышенного интереса к ней, например, в связи с юбилеем, то, безусловно, на нее нужно откликаться. К таким рубежным, знаковым датам относится получение в 1956 году Артуром Корнбергом первого в мире доказательства возможности биосинтеза ДНК *in vitro* с последующим выделением фермента этого синтеза – ДНК-полимеразы.

Нужно заметить, что и сам первооткрыватель хорошо знал цену своему проникновению в глубочайшую тайну жизни. Не случайно он выстраивает его в один ряд с эпохальным открытием бесклеточного брожения

Э. Бухнером в 1897 г. В самом деле, воспроизведение жизненных процессов в пробирке было величайшим завоеванием человеческого разума. Это не были фантазии Г.М. Бошьяна или О.Б. Лепешинской, а строгое научное знание. В 50-е годы величие первооткрывательской работы А. Корнберга ощущалось не так, как сейчас, при ретроспективной оценке, но от этого значение ее не умаляется нисколько.

А. Корнберг совершил свое выдающееся открытие в 38 лет. К этому времени он был известным биохимиком, профессором и руководителем кафедры микробиологии в Вашингтонском университете (Сент-Луис).

Он окончил университет в Рочестере в 1941 г. В годы войны служил судовым врачом, пока его не приметил Ролла Юджин Дайер, директор Национального института здоровья (1942–1950), и не пригласил на работу в исследовательскую группу лаборатории питания этого института. Здесь он трудился в 1942–1945 гг., после чего в 1946 г. перешел в лабораторию Северо Очоа в Нью-Йоркском университете. Далее его научная карьера опять связывается с Национальным институтом здоровья в Бетесде, где он в течение 1947–1953 гг. возглавлял отдел ферментов и метаболизма. В это время он занимался проблемой получения коэнзимов, что послужило в дальнейшем хорошей основой для исследований биосинтеза ДНК из более простых молекул.

Будет крайне некорректно, если не будет с исторической точки зрения проанализировано его формирование как энзимолога. Об Очоа уже упоминалось. От него, бывшего к тому времени довольно опытным биохимиком и энзимологом, Корнберг из первых рук получил важные базовые знания о ферментах. Без сомнения, Очоа рассказывал начинающему исследователю о выдающихся немецких биохимиках Варбурге, Мейергофе, у которых он трудился, об их методах работы и идеях. В дальнейшем это было закреплено работой Корнберга в 1947 г. в лаборатории супругов Кори в Вашингтонском университете, в Сент-Луисе. Общеизвестен авторитет

\* Автор для переписки:

© 2006 г. Воробьев Вадим Сергеевич,  
к.м.н., член Центрального Правления ОБР  
119296 Москва, Университетский пр-т, 9  
E-mail: obr@biorosinfo.ru

Нобелевских лауреатов 1947 года Карла и Гертти Кори в области энзимологии. Кроме того, молодой энтузиаст в летнее время стажировался в Колумбийском университете с целью восполнить пробелы в области органической и физической химии при работе с методами очистки ферментов. Все это привело ученого к правильной оценке значения ферментов в исследовании жизненных процессов. Больше того, он стал стойким приверженцем данного научного направления, посвятил этому серию книг, статей и оставил ряд интересных высказываний [1, 7]. Вот как он говорит о ферментах в своей статье «Воспоминания о наших учителях» [7]:

«Получив воспитание у супругов Кори, Очоа и других звезд в галактике того времени, я стал адептом идеи, что энзимология — самый эффективный путь к пониманию явлений жизни. Я обнаружил ферменты, которые синтезируют коэнзимы (НАД, НАДФ, ФАД) и пиримидиновые и пуриновые нуклеотиды, и после этого надеялся пойти дальше, чтобы найти фермент синтеза ДНК. Я имел в виду фермент, который так же, как и гликогенфосфорилаза Кори, будет наращивать цепочку ДНК последовательным добавлением соответствующим образом активированного нуклеотида. Я никогда не представлял себе, что мои попытки могут привести к ферменту, не похожему на других, который направлял бы действие от субстрата и собирал бы нуклеотиды парой оснований по модели Уотсона—Крика, для того чтобы создать комплементарную копию материнской цепочки ДНК».

Итак, обосновавшись в Сент-Луисе, 35-летний профессор стал постепенно подбираться к главному делу своей жизни. В Нобелевской лекции и других своих трудах он, по крайней мере, частично раскрывает «кухню» динамики открытия.

Ясно, что открытие состоялось не на пустом месте. И из вышеприведенной цитаты, и из анализа цикла трудов ученого до 1956 года следует, что у него после приобретения достаточного опыта в энзимологии возникли серьезные намерения осуществить ферментативный синтез и молекулы ДНК, структура которой стала понятной после публикации статьи Дж. Уотсона и Ф. Крика в 1953 г. Однако подход к этому у А. Корнберга был на основе реакции конденсации, которую он наблюдал при синтезе дифосфопиридиннуклеотида (ДФН) — ныне НАД — и флавинадениннуклеотида (ФАД), а также других коферментов (коэнзим А и т.д.). Рабочая гипотеза состояла в постулировании механизма удлинения молекулы ДНК с помощью реакции конденсации: при этом дезоксирибонуклеозид 5'-трифосфат

на растущем конце полидезоксинуклеотидной цепочки атакуется 3'-гидроксильной группой с высвобождением неорганического пирофосфата и удлинением цепочки на одну единицу.

На деле все произошло не так. Кроме того, нужно было решиться на априорное признание возможности самого принципа синтеза наследственной молекулы в пробирке. Артур Корнберг констатировал в лекции на Нобелевских торжествах 1959 года, что еще 5 лет назад (в 1954 г.) синтез ДНК рассматривался как «витальный» процесс, то есть протекающий внутриклеточно. Предстояло преодолеть этот барьер. Как всегда бывает у биохимиков, все оказалось очень просто: взял одно, добавил другое, получил третье.

В декабре 1955 года Корнберг обнаружил, что под действием экстракта логарифмической фазы роста *E. coli*  $^{14}\text{C}$ -тимидин превращается в присутствии АТФ в нерастворимый в холодной трихлоруксусной кислоте продукт. Специфическая радиоактивность меченного  $^{14}\text{C}$  тимидина была низкой, при этом менее 100 cpm [counts per minute] выше фона включалось из  $\approx 10^6$  cpm, прибавленного для проведения реакции. Однако обработка продукта кристаллической ДНКазой поджелудочной железы, которая тогда становилась доступной, переводила всю радиоактивность в кислоторастворимое состояние. Это была первая демонстрация возможности биосинтеза ДНК *in vitro*. Публикация о данном факте последовала в июле 1956 г. в «*Biochimica et Biophysica Acta*». Далее в течение 3 лет вышла серия статей Корнберга с коллегами под общим названием «Ферментативный синтез ДНК», в которых последовательно представлялись доказательные факты об очистке ДНК-полимеразы, о множественной функции получаемой ДНК, о выделении ДНК-полимеразы, об инициации действия ДНК-полимеразы с шаблона (или «затравки») ДНК (то есть доказательстве того ошеломляющего факта, что ферментативный синтез ДНК-полимеразой *E. coli* представляет собой репликацию матрицы ДНК) и т.д. Следует заметить, что публикации под указанным стереотипным названием продолжались и в 60-е годы. Однако решающее дело было сделано в 1956 году, и с этого времени биосинтез ДНК *in vitro* стал реальностью. Хотя в 50-е годы А. Корнбергу не удалось получить биологически активную форму ДНК вне организма, тем не менее дорога, по которой надо идти, была указана. И поэтому не зря ученый в Нобелевской речи сравнил ДНК с «магнитной лентой, на которой записаны точные инструкции по выполнению той или иной работы» и с которой можно

«снимать точные копии, так что эту информацию можно использовать в любом месте и в любое время».

Нельзя сказать, что путь признания открытия Корнберга был усыпан розами. Достаточно привести факт, что такой старейший (в 2005 году ему исполнилось 100 лет) и авторитетный журнал, как «Journal of Biological Chemistry», отклонил осенью 1957 года две статьи Корнберга с сотрудниками, посвященные частичной очистке и общим свойствам ДНК-полимеразы из кишечной палочки. Однако вмешательство Джона Эдсола, ставшего главным редактором журнала в мае 1958 г., помогло восстановить справедливость, и в июле этого года обе статьи вышли в свет [6, 7].

Надо напомнить, что в это время шел параллельным курсом великий Очоа, который в 1955 г. открыл фермент полинуклеотидфосфорилазу, синтезировавший *in vitro* РНК-подобные полимеры (впоследствии была показана его РНК-расщепляющая функция).

Всеобщее признание их открытий в научной среде последовало незамедлительно, и в 1959 году оба выдающихся исследователя, учитель и ученик, были удостоены Нобелевской премии по медицине «за открытие механизмов биологического синтеза рибонуклеиновой и дезоксирибонуклеиновой кислот».

Триумф не ослабил мотивации Корнберга к исследовательской работе. В 1959 г. он организовал кафедру биохимии в Стенфордском университете (Пало-Альто, Калифорния) и возглавлял ее до 1969 г., после чего стал здесь же профессором. С 1988 г. является заслуженным профессором этой кафедры, продолжая активно трудиться до сих пор. На этой же кафедре работают и другие знаменитости, в их числе и Нобелевский лауреат 1980 г. Пол Берг, ученик А. Корнберга.

В стенфордский период Корнбергом было продолжено исследование ферментов метаболизма ДНК, ответственных за инициацию и удлинение цепочек ДНК и хромосом. Эти ферменты послужили основой для приближения эры генетической инженерии. Важной датой в этом цикле исследований является 1967 год, когда А. Корнберг вместе со своим сотрудником М. Гулианом, используя вирус Синшеймера, поражающий *E. coli*, впервые синтезировали биологически активную кольцевую двухцепочечную ДНК. Наконец, венцом в этой последовательности событий является получение рекомбинантной ДНК стенфордским профессором П. Бергом в 1972 г., что, по сути, совершило биотехнологическую революцию.

Таким образом, несмотря на то, что в молекулярной биологии блистает множество ярких имен, на

ключевом направлении биосинтеза ДНК и РНК вне организма во времени выстраивается триада имен: Очоа (1955) – Корнберг (1956) – Берг (1972), или открытий: РНК-аза (1955) – ДНК-полимераза (1956) – рекомбинантная ДНК (1972). Эти имена, даты и открытия вбирают в себя все существенное, достигнутое современниками, и являются золотыми ступенями научно-технического прогресса XX века. Что удивляет в этом ряду, так это цепь «учитель – ученик – ученик ученика», то есть налицо эстафета преемственного познания истины. А. Корнберг стажировался после окончания университета у С. Очоа в 1946 г. в Нью-Йорке, а П. Берг был сотрудником А. Корнберга в Вашингтонском и Стенфордском университетах в 50–60-е годы.

Научная деятельность Корнберга отражена в многочисленных статьях. Особо надо отметить его книги, выход каждой из которых был событием в научном мире. Так, его книга «Синтез ДНК» вышла в свет на английском языке в 1974 г., а в 1977 г. была переведена и издана на русском языке. Огромной популярностью у англоязычных читателей пользуется его автобиографическая книга «Ради любви к ферментам: одиссея биохимика» (1989), отличающаяся незаурядным беллетристическим талантом, искренностью и потребностью в самовыражении, свойственным творческим личностям. В последнее время вышла его книга сходного жанра о биотехнологии (1995).

Окажется необъективным и обеднит биографический анализ, если не упомянуть об обращении ученого к теме неорганических полифосфатов. Он переключился с исследований репликации ДНК (кстати, им предложена гипотеза механизма репликации ДНК в интактной клетке) на их изучение в 1991 году. Надо сказать, что на Западе неорганические полифосфаты традиционно считали ископаемыми молекулами; правда, хотя и рассматривали их в контексте пребиотической эволюции, отмечали их наличие у всех ныне встречающихся бактерий, растительных и животных клеток. Резонно заметить, что в России им уделял большое внимание Андрей Николаевич Белозерский (надо отдать должное его беспрецедентной интуиции!), он сам занимался этим в экспериментальном плане и передал данную тему своему ученику И.С. Кулаеву, который осветил результаты своих работ в серии публикаций, в том числе и в книге на английском языке в 1979 году. А. Корнберг по достоинству оценил вклад российских ученых в данную проблему, поместив благодарность профессору И.С. Кулаеву в журнале «Биохимия» (2000).

А. Корнбергу удалось изучить разнообразные функции неорганических полифосфатов: резервуары энергии и фосфатов, хелатирование металлов ( $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ), буферные антищелочные свойства, образование капсулы бактерий, подвижность и вирулентность некоторых патогенов и многие другие. Им исследованы ферменты синтеза и утилизации неорганических полифосфатов.

Конечно, Корнберг удостоен различных наград и почестей как у себя на родине, так и за рубежом. Понятно, что их больше всего в США. Помимо Нобелевской премии, он избран членом Лондонского королевского общества (1970), почетным членом Парижского университета (1960), докладчиком Рамон-и-Кахалевской лекции (2001) и др. Его вклад в науку и профессиональное долголетие восхищают и служат примером для следующих поколений исследователей.

В заключение надо подчеркнуть истинное благородство ученого и его бесконечное уважение к предшественникам и товарищам по работе. Известны высказывание Ньютона о том, что он видел дальше, потому что стоял на плечах гигантов [Галилея и Кеплера — авт.], или афоризм Клода Бернара: «Искусство — это я, наука — это мы». А вот что сказал А. Корнберг в конце своей Нобелевской лекции: «В заключение позвольте повторить то, что я сказал на вчерашнем банкете. Любая оценка моего труда должна быть разделена с моими коллегами в Нью-Йорке, Бетесде, Сент-Луисе и Стенфорде, а также со всем международным сообществом химиков, генетиков и физиологов, которое действительно ответственно за прогресс в биохимии нуклеиновых кислот». Конечно, нельзя не упомянуть и о его признательности учителям, которую он многократно выказывал в своих публикациях, находя для этого точные и красивые слова, соответствующие его несомненному литературному дару и безукоризненному стилю.

## Литература

1. Корнберг А. Синтез ДНК: Пер. с англ. — М., 1977.
2. Корнберг А. — БМЭ, 3-е изд., 1979. — Т. 11. — С. 377.
3. Корнберг А. День уважения профессору Игорю С. Кулаеву // Биохимия. — 2000. — Т. 65. — № 3. — С. 334.
4. Лауреаты Нобелевской премии. Энциклопедия: Пер. с англ. В 2-х т. — М.: Прогресс, 1992. — 775 + 861 с.
5. Bessman M. J., Lehman I. R., Simms E. S., and Kornberg A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. II. General properties of the reaction // J. Biol. Chem. 1958. — Vol. 233 (1). — P. 171–177.
6. Brown M.R.W. and Kornberg A. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2004. — Vol. 101. — P. 16065–16087.
7. Goulian M., Kornberg A., Sinsheimer R.L. Enzymatic synthesis of DNA. XXIV. Synthesis of infectious phage PhiX174 DNA // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1967. — Vol. 58. — P. 2321–2328.
8. Kornberg A. Enzymatic synthesis of DNA. — John Wiley & Sons, 1961.
9. Kornberg A. DNA synthesis. — W.H. Freeman and Co., San Francisco, 1974.
10. Kornberg A. The biologic synthesis of deoxyribonucleic acid / In: Nobel Lectures in Molecular Biology 1933–1975. — N.-Y.: Elsevier, 1977. — 534 p. (имеется на сайте: <http://www.nobelprize.org/>).
11. Kornberg A. DNA replication. — W.H. Freeman and Co., San Francisco, 1980 (2<sup>nd</sup> ed., 1992, Baker T. — co-author).
12. Kornberg A. The early history of DNA polymerase: a commentary on «Enzymic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid» // Biochim. Biophys. Acta. — 1989. — Vol. 1000. — P. 53–56.
13. Kornberg A. For the love of enzymes: The Odyssey of biochemist. — Cambridge, Mass.: Harvard University Press, 1989. — 336 p. (reprint ed., 1991).
14. Kornberg A. The golden helix: Inside biotech ventures. — University Science Books, 1995.
15. Kornberg A. Remembering our teachers // J. Biol. Chem. — 2001, January 5. — Vol. 276 (1). — P. 3–11.
16. Kornberg A. How I became a biochemist // IUBMB Life. — 2002. — Vol. 53. — P. 185–186.
17. Kornberg A. Ten commandments of enzymology, amended // Trends in Biochem. — 2003. — Vol. 28. — P. 515–517.
18. Kornberg A. and Fraley C.D. Inorganic polyphosphate: a molecular fossil come to life // ASM News. — 2000. — Vol. 66. — P. 275–280.
19. Kornberg A., Lehman I.R., Bessman M.J., Simms E.S. Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid // Biochim. Biophys. Acta. — July 1956. — Vol. 21 (1). — P. 197–198 (reprinted in Biochim. Biophys. Acta. — 1989. — Vol. 1000. — P. 57–58).
20. Kresge N., Simoni R.D., and Hill R.L. Arthur Kornberg's discovery of DNA polymerase I // J. Biol. Chem. — 2005. — Vol. 280 (49). — e46–e48 (<http://www.jbc.org/cgi/content/full/280/49/e46>).
21. Lehman I.R. Discovery of DNA polymerase // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278 (37). — P. 34733–34738.
22. Lehman I. R., Bessman M. J., Simms E. S., and Kornberg A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. — 1958. — Vol. 233 (1). — P. 163–170.



23. *Lehman I.R., Zimmerman S.B., Adler J., Bessman M.J., Simms E.S., and Kornberg A.* Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. V. Chemical composition of enzymatically synthesized deoxyribonucleic acid // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1958. – Vol. 44 (12). – P. 1191–1196.

24. *Sourkes T.L.* Nobel Prize Winners in Medicine and Physiology 1901–1965. – London etc.: Aberland-Schuman, 1966. – 464 p.

Были использованы Интернет-материалы, в том числе:

<http://biochemistry.stanford.edu/>

<http://www.jbc.org>

<http://en.wikipedia.org/>

**Резюме.** Статья посвящена 50-летию со дня открытия ДНК-полимеразы Артуром Корнбергом. По этому случаю проанализированы исторические факты жизни и деятельности ученого.

*Ключевые слова:* история биологии, персоналия, биографии ученых, Артур Корнберг, ДНК-полимераза.

## TO 50<sup>th</sup> ANNIVERSARY OF THE IMPORTANT MILESTONE IN THE DEVELOPMENT OF MOLECULAR BIOLOGY – A DISCOVERY OF DNA POLYMERASE BY ARTHUR KORNBERG

V.S. VOROBYEV, O.V. VOROBYEVA

*Ovchinnikov Society of Biotechnologists of Russia, Moscow*

The article was devoted to 50<sup>th</sup> anniversary of the discovery of DNA polymerase by Arthur Kornberg. Some historical details and vital events were analyzed on this occasion.

*Keywords:* biology history, personnel, scientists biographies, Arthur Kornberg, DNA polymerase.



## ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2006 ГОДА

### СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

#### К 35-летию НИКТИ биологически активных веществ \*

**1 января 2006 г.** Научно-исследовательскому конструкторско-технологическому институту биологически активных веществ (НИКТИ БАВ) исполнилось 35 лет.

В 1966 г. было создано Главное управление микробиологической промышленности при Совете Министров СССР. В 1970 г. было организовано Специальное конструкторско-технологическое бюро биологически активных веществ (СКТБ БАВ) как подразделение Бердского химического завода, которое в 1971 г. превратилось в отдельную самостоятельную структуру. Основные задачи СКТБ БАВ были связаны с созданием отечественной базы по получению широкой номенклатуры биохимических препаратов.

На начальном этапе деятельности предприятие решало задачи создания отечественной биотехнологии, разрабатывая новые технологические приемы и методы получения биологических веществ из микробиологического сырья. За период с 1972 по 1986 гг. сотрудниками были разработаны лабораторные методики и опытно-технологические регламенты на получение более 100 биохимических реагентов микробиологического происхождения для научных исследований в областях фундаментальной и прикладной биологической науки. Получено 142 авторских свидетельства, 24 медали ВДНХ.

В 1981 г. организация была преобразована в Научно-исследовательский конструкторско-технологический институт биологически активных веществ (НИКТИ БАВ). Первым директором НИКТИ БАВ стал к.х.н. (ныне д.х.н.), профессор С. Н. Загребельный.

В 1985 г. Управлением микробиологической промышленности при СМ СССР было создано НПО «Вектор» (п.г.т. Кольцово, Новосибирской обл.), в состав которого вошел НИКТИ БАВ. Вхождение в НПО «Вектор» позволило сконцентрировать усилия на создании противовирусных препаратов, основанных на дсРНК.

Результатом такого взаимодействия явилась разработка и производство противовирусного препарата ридостин, действующее начало которого — дсРНК киллерных пекарских дрожжей. Были созданы также мазевые формы препарата Ридостин и препараты, обладающие пролонгированным действием на систему неспецифической защиты.

С конца 80-х годов и до настоящего времени деятельность НИКТИ БАВ связана с развитием направления по созданию терапевтических и диагностических средств. Достижения биотехнологии позволили разработать принципиально новое поколение фармакологических препаратов, основанных на рекомбинантных белках человека. К 1984 году совместными усилиями ученых ВНИИ молекулярной биологии (Новосибирск), Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов был осуществлен синтез гена интерферона- $\alpha 2$ , создан бактериальный штамм-продуцент и получен генно-инженерный белок — интерферон- $\alpha 2$ . Впоследствии из состава НИКТИ БАВ выделилось предприятие — Научная опытно-производственная база (НОПБ), (п.г.т. Кольцово, Новосибирской области), которое и осуществило промышленный выпуск этого препарата в 90-х годах.

Приобретенный опыт в дальнейшем был использован НИКТИ БАВ для получения субстанций и лекарственных форм препаратов, активным началом которых явились такие цитокины, как фактор некроза опухолей  $\alpha$ ,  $\beta$ , интерферон- $\gamma$ , колониестимулирующие факторы (гранулоцит-колониестимулирующий и гранулоцит-макрофаг-колониестимулирующий фактор).

В настоящее время препарат, содержащий фактор некроза опухолей  $\alpha$  (коммерческое название — Альнорин), проходит клинические испытания как противоопухолевое средство в Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина РАМН, фактор некроза опухолей- $\beta$  (коммерческое название — Бифнорин) как противогерпетическое средство исследуется в НИИ клинической иммунологии СО РАМН. На стадии регистрации находится гемостимулирующий препарат Нейтростим, действующим началом которого является гранулоцит-колониестимулирующий фактор, который предполагается для применения у онкологических больных при химиотерапии, лучевой терапии.

\* Материал подготовлен В.И. Масычевой, профессором, д.б.н., директором ИМБТ ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор»

## ПЕРСОНАЛИИ

### К 125-летию со дня рождения Александра Флеминга

Научно-технический потенциал НИКТИ БАВ активно используется в ГНЦ ВБ «Вектор» при разработке ряда различных препаратов. К ним относятся ранозаживляющие средства — хитогель и коллагель, на которые получено разрешение на проведение клинических испытаний, гиалуроновая кислота, вакцины как на основе рекомбинантных сальмонелл для профилактики гепатита С и ВИЧ-инфекции, так и генно-инженерных антигенов с использованием средств адресной доставки.

Следует также отметить достижения Института в области разработки препаратов для ветеринарии. Препараты Поливедрим и Вестин, а также Эндоглокин, Субалин, Альнорин, которые не имеют аналогов на отечественном рынке, разрешены для применения Ветфармсоветом РФ и используются в ветеринарии как средства повышения устойчивости к инфекционным воздействиям. В этих испытаниях большой объем работы был выполнен совместно с Институтом ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН, Аграрным университетом (Новосибирск).

Отдельным направлением деятельности института следует считать создание иммунодиагностических средств. Начало этой деятельности относится к середине 80-х годов, когда в стране возникла острая проблема диагностики ВИЧ/СПИД. В СССР первые образцы такого набора были получены в НИКТИ БАВ в 1985 г., а в 1986 г. было организовано производство 30000 наборов тест-систем на выявление антител к ВИЧ. За прошедшее время совместно с ЗАО «Медико-биологический союз» (Новосибирск) разработаны тест-системы для выявления антител к хламидиям, гепатиту В, С, ведутся работы по созданию диагностикумов для кори, паротита.

За последние 5 лет было разработано 12 технологических документов, 11 фармакопейных статей. Получено 14 дипломов 1- и 2-й степени. Опубликовано 226 работ в отечественных и зарубежных журналах, материалах съездов, симпозиумов, конференций. На сегодняшний день 8 препаратов внедрены в медицинскую и ветеринарную практику, на 16 препаратов после проведения экспертизы соответствующими органами Министерства здравоохранения РФ получены разрешения на клинические испытания.

В 2004—2005 гг. осуществлен переход ФГУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» в структуру Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. В 2006 г. НИКТИ БАВ переименован в Институт медицинской биотехнологии.

6 августа 2006 г. исполняется 125 лет со дня рождения Александра Флеминга (1881—1955), первооткрывателя пенициллина, лауреата Нобелевской премии. В связи с этим редколлегия журнала считает долгом кратко прокомментировать эту юбилейную дату. Флеминг родился и получил начальное образование в Шотландии. В Лондоне он окончил Политехническую школу, после чего поступил в Медицинскую школу при госпитале Св. Марии Лондонского университета. По окончании учебы он стал работать в лаборатории патологии под руководством А. Райта, известного ученого, открывшего опсонины. Упорный, молчаливый шотландец первым приходил и последним уходил из лаборатории. Результат последовал: в 1921 г. Флеминг открыл фермент лизоцим. Через 7 лет, в 1928 г. наблюдательный ученый заметил, что в чашках с культурами стафилококка места, занятые плесенью, были свободны от бактерий. Изучив плесень (это был гриб из рода *Penicillium*), он выделил из нее сильное антибиотическое вещество, названное им пенициллином. Результаты наблюдений были опубликованы в 1929 г. Однако в научной среде эти факты остались без внимания. Не помогло и публичное выступление исследователя на II Международном конгрессе микробиологов в 1936 г. Флеминг в течение 10 лет искал химика, который сумел бы выделить пенициллин в чистом виде, пока судьба не свела его с Хоуардом Флори и Эрнстом Чейном. Они вместе в 1940 г. получили очищенный препарат, экспериментальная и клиническая апробация которого показала высокую эффективность. Дальше последовала промышленная наработка пенициллина в США к 1944 г., чему способствовали запросы армии в условиях войны. Затем пришло мировое признание и вручение Нобелевской премии по медицине в 1945 г. всем трем его участникам. Последовали награды и почетные звания из многих стран мира. В Великобритании Флемингу также были оказаны всевозможные почести: в 1944 г. Флеминг был возведен в рыцарское достоинство, в 1951 г. студенты Эдинбургского университета избрали его ректором. Умер А. Флеминг в 1955 г. и был похоронен по высшему национальному разряду — в Соборе Святого Павла, рядом с адмиралом Г. Нельсоном и герцогом А. Веллингтоном. Биография ученого описана Андре Моруа в книге «Жизнь Александра Флеминга» (Серия «ЖЗЛ», 1964).

## СОБЫТИЯ ПЕРВОГО ПОЛУГОДИЯ 2006 ГОДА

## Некролог

## Памяти академика РАМН А.А. Воробьева



Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, редколлегия и редакционный совет журнала «Вестник физико-химической биологии и биотехнологии им. Ю.А. Овчинникова» с глубоким прискорбием извещают, что **23 марта 2006 года** после непродолжительной тяжелой болезни скончался президент Общества биотехнологов России, заведующий кафедрой микробиологии с вирусологией и иммунологией ММА им. И.М. Сеченова, академик РАМН Анатолий Андреевич Воробьев.

А.А. Воробьев родился в 1923 г. в Краснодарском крае. В 1945 году окончил Военно-морскую медицинскую академию (Ленинград). В 1945–1948 гг. служил врачом на Военно-морском флоте. С 1948 по 1951 гг. обучался в адъюнктуре при кафедре физической и коллоидной химии Военно-морской медицинской академии. В 1951 году защитил кандидатскую диссертацию «Очищенный сорбированный гидратом окиси алюминия столбнячный анатоксин» под руководством своего учителя к.м.н. А.В. Марковича. После защиты диссертации работал в течение 1951–1956 гг. старшим научным сотрудником Военно-морской медицинской академии.

С 1956 по 1978 гг. состоял на разных должностях в НИИ Министерства обороны СССР (от заместителя и начальника научного отдела до заместителя начальника института по научной работе). В 1978–1987 гг. работал

в должности первого заместителя начальника по научной работе Главного управления «Биопрепарат» при Главмикробиопроме СССР (впоследствии при Министерстве медицинской и микробиологической промышленности СССР). С 1987 г. до самой смерти заведовал кафедрой микробиологии с вирусологией и иммунологией ММА им. И.М. Сеченова.

В 1959 г. А.А. Воробьев защитил докторскую диссертацию по проблеме конструирования сорбированных анатоксинов. В 1964 г. ему было присвоено звание профессора по специальности «Иммунология». В 1984 году он был избран членом-корреспондентом, в 1990 г. — академиком АМН СССР (ныне — РАМН). С 1990 г. по 1 марта 2006 г. являлся заместителем академика-секретаря Отделения профилактической медицины РАМН. В 2003 г. был избран Президентом Общества биотехнологов России. Имел воинское звание генерал-майора медицинской службы (присвоено в 1975 г.).

Научные интересы А.А. Воробьева находились в области иммунологии, микробиологии, вирусологии, биотехнологии. Им было опубликовано более 550 научных работ, из них 25 книг. Под его руководством защищено 36 докторских и более 40 кандидатских диссертаций.

Наряду с теоретическими исследованиями он участвовал в практической разработке рекомбинантного интерферона альфа-2, в создании диагностических, лечебных и профилактических препаратов для борьбы с вирусными заболеваниями.

Он состоял членом редколлегии «Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунологии» (с 1967 г.), журнала «Иммунология» (с 1981 г.), журнала «Вакцинация» (с 1999 г.), заместителем главного редактора журнала «Вестник РАМН» (с 1994 г.). Он являлся членом экспертного Совета ВАК СССР (затем России) (с 1968 г.), заместителем председателя специализированного Совета ВАК РФ (с 1999 г.), членом правления Всесоюзного общества иммунологов (с 1983 г.), членом Комитета по Ленинским и Государственным премиям СССР (1985), членом Редсовета БМЭ (1988), членом Межведомственного совета Комитета по науке и технике РФ «Науки о жизни и биотехнология» (1992), членом Президиума и руководителем секции Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (с 1996 г.), членом

экспертного Совета по биобезопасности при Госдуме РФ (2001), членом Совета РАН по проблемам химического и биологического оружия (2001).

А.А. Воробьев — лауреат Государственной премии СССР (1980), премии Правительства РФ (2000), Государственной премии РФ (2001). Он был удостоен именных премий: РАМН — имени Н.Ф. Гамалеи (1995), Российской академии медико-технических наук — имени М.П. Чумакова (1997), имени А.Л. Чижевского (1999), имени И.Н. Блохиной (2001). Ему присуждена серебряная медаль им. И.П. Павлова РАЕН (1999). В 1997 г. ему присвоено звание «Заслуженный деятель науки РФ». Он был избран членом и отмечен наградами различных академий (в том числе он избирался первым вице-президентом Российской академии медико-технических наук).

А.А. Воробьев был награжден орденами Трудового Красного Знамени, Отечественной войны I степени, двумя орденами Красной Звезды, медалями.

До последних дней своей жизни Анатолий Андреевич был активен, полон энергии и замыслов. Он был неординарной личностью с широким кругом интересов, добрым, мудрым, рассудительным человеком, обладал талантом рассказчика, писателя и даже поэта. Много сил отдавал делу возрождения отечественной биотехнологии, находясь более двух лет на посту президента Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. В этом был его долг ученого и патриота. Не случайно в одном из последних интервью по поводу спорта он сказал, что лучшее лекарство от допинга — патриотизм. Утрата его болезненна и невосполнима для всех близко общавшихся с ним и трудившихся вместе.

Похоронен А.А. Воробьев на Троекуровском кладбище г. Москвы.

Незадолго до кончины Анатолий Андреевич задумал провести в Петербурге, городе своей молодости, конференцию по биобезопасности. Она состоялась 1–2 июня 2006 г., но уже без него и была посвящена его памяти.

#### *Книги А.А. Воробьева*

- Статистические методы в микробиологических исследованиях (1962) — с соавт.
- Анатоксины (1965) — с соавт.
- Адъюванты (1969) — с соавт.
- Специфическая профилактика риккетсиозов (1969) — с соавт.
- Безыгольный способ введения биологических препаратов в организм (1972) — с соавт.

- Общая и частная эпидемиология. Ред. Д.В. Волжинский (1973).
- Аттенуация вирусов и риккетсий (1976) — с соавт.
- Научные основы получения чистых культур микроорганизмов в технологии вакцин (1977) — с соавт.
- Массовые способы иммунизации (1977) — с соавт.
- Молекулярные основы иммуногенности антигенов (1982) — с соавт.
- Краткий терминологический словарь микробиолога-биотехнолога. Ред. Ю.А. Овчинников (1989) — с соавт.
- Основы медицинской биотехнологии (1990).
- Методы и средства микроанализа биологически активных веществ (1990).
- Неспорообразующие анаэробы и их роль в патологии человека (1990) — с соавт.
- Эндогенные иммуномодуляторы (1992) — с соавт.
- Клиническая иммунология. Ч. 1, 2 (1992, 1994) — с соавт.
- Микробиология (1994), 2-е изд. — 1998 г.
- Микробиология и иммунология. Учебник для сестер с высшим образованием (1999) — с соавт.
- Микробиология и иммунобиология (2000).
- Компьютерный атлас по микробиологии. Ред. А.А. Воробьев, А.С. Быков (2001).
- Микробиология с вирусологией и иммунологией. Учебник для средних мед. учреждений. Ред. А.А. Воробьев, Ю.С.Кривошеин (2001).
- Не подводя черты. Воспоминания академика — микробиолога и иммунолога (2003).
- Двадцатый век моими глазами (2005).

#### *Ключевые статьи в журналах и сборниках*

- Основные итоги и перспективы исследований в области разработки и усовершенствования бактериальных анатоксинов / В сб. Специфическая профилактика инфекционных заболеваний (1964).
- Опыт проведения вакцинации против оспы безыгольным методом // Военно-медицинский журнал, 1969, № 6 — с соавт.
- Итоги и перспективы разработки массовых способов иммунизации // Вестник АМН СССР, 1975, № 4 — с соавт.
- Итоги исследований по разработке и испытанию таблетированной живой пероральной оспенной вакцины // ЖМЭИ, 1978, № 4 — с соавт.
- Молекулярная биология дифтерийного токсина в связи с проблемой механизма действия токсических белков // Успехи совр. биологии, 1978, т. 86, в. 3 (6).



- Иммуная биотехнология: задачи и перспективы // Иммунология, 1986, № 3 — с соавт.
- Успехи и перспективы генетической инженерии в области создания медицинских препаратов // Вестник РАМН, 1992, № 2.
- Значение микробиологии в снижении инфекционной заболеваемости // Эпидемиология, 1996, № 1 — с соавт.
- Взгляды на развитие иммунологии в первой половине XXI века // Вестник РАМН, 1999, № 11.
- Иммунобиотехнология на пути в XXI век // Вестник РАМН, 1999, № 11.
- Таксономия и классификация риккетсий // ЖМЭИ, 2000, № 2 — с соавт.
- Микробиология на рубеже XXI века // Врач, 2000, № 8 — с соавт.

### Международный конгресс «БИО-2006» \*

9–12 апреля 2006 г. в Чикаго (США) состоялся Международный конгресс «БИО-2006». Это было самое крупное мероприятие подобного рода в истории — в нем приняло участие около 20000 человек, 1600 компаний из 30 стран мира. Состоялось около 200 симпозиумов и круглых столов, 250 презентаций компаний. Все это происходило в комплексе с огромной выставкой. Нужно отметить высокий уровень мероприятия — наряду с руководителями крупнейших мировых биотехнологических корпораций и ведущих ученых в форуме участвовали руководители государств и правительств, известные политики, бизнесмены, финансисты. Было беспрецедентное освещение в СМИ — журналистский корпус, аккредитованный при «БИО-2006», насчитывал свыше 500 человек. Мероприятие широко транслировалось по всем основным телеканалам мира. Надо сказать, что конгресс проводится ежегодно: следующие запланированы таким образом — 6–9 мая 2007 г. (Бостон), 18–21 июня 2008 г. (Сан-Диего), 17–20 мая 2009 г. (Атланта). Это лишнее свидетельство жизнеспособности и перспективности столь представительного, высокопрофессионального собрания биотехнологов.

Многообразной и насыщенной была тематика заседаний: биозащита, биоэтика, развитие бизнеса, онкология, оборудование и диагностикумы, глобальный бизнес, разработка лекарств, рынок и финансы, право и интеллектуальная собственность, питание, сельское

хозяйство, производство, экология, нанотехнологии, трансфер технологий и лицензирование и т.д.

В течение трех дней прошел смотр того, что представляет собой биотехнология в мире и каковы перспективы ее развития. В этой связи необходимо отметить следующее.

**1. Биотехнологическая наука и промышленность являются сегодня важнейшим экономическим и политическим фактором развития в мире.** На протяжении последних лет (особенно после 2000 г.) эта отрасль демонстрирует небывалые темпы роста, прямые инвестиции в нее за этот период превысили 120 млрд. долларов. С ней связывают решение глобальных проблем человечества — обеспечение питанием, решение проблем здравоохранения, энергетики, защиты окружающей среды. По мнению экспертов, в 2005 г. биоэкономика стала свершившимся фактом, поскольку в одной точке сфокусировались интересы экономики, требования рынка и возможности технологии. Биотехнология рассматривается как существенный фактор развития экономики и решения социальных проблем, в частности, проблемы образования и создания рабочих мест. Как отметил президент БИО (Biotechnology Industry Organization) Дж. Гринвуд, свыше 90% компаний, входящих в эту крупнейшую биотехнологическую организацию мира, — это малые и средние фирмы. Поэтому развитие биотехнологии во многих государствах (включая США, Евросоюз, Китай, Индию, Бразилию и многие другие) объявлено национальным приоритетом, созданы соответствующие программы. Наряду с этим внутри самих указанных стран многие области (регионы) проводят собственную политику всемерного развития биотехнологии: на форуме было представлено свыше 100 таких биорегионов. Так, в США подобные региональные программы имеются практически во всех штатах — в особенности впечатляют успехи Калифорнии, где эффективно функционируют десятки биотехнологических компаний. Аналогично обстоит дело в Германии. Идет настоящая «биотехнологическая гонка», соревнование между регионами. В качестве примера страны, которая сравнительно недавно стала развивать биотехнологию и добилась реальных позитивных результатов, можно привести Ирландию. В этой стране, включившейся в «биотехнологическую гонку» всего 5 лет назад, количество биотехкомпаний за данный период увеличилось с 6 до 72, большинство ведущих биотехкомпаний мира открыло там свои филиалы; ежегодный объем инвестиций в отрасль (включая государственные) составляет около 0,5 млрд. долларов в год. Можно указать и на Малайзию, где для реализации

\* Материал подготовлен Р.Г. Васильевым



Национальной биотехнологической политики в 2005 году создана Малайзийская биотехнологическая корпорация с бюджетом 1 млрд. долларов.

**2. Прогресс биотехнологической науки и практики сегодня охватывает практически все сферы деятельности человека.** В то же время следует отметить несколько основных направлений «прорыва», с которыми связывают главные перспективы и на которые направлены основные усилия: биотопливо, перевод химической промышленности на возобновляемое сырье, бионано- (или нанобио-) технологии.

**Биотопливо.** Биоэтанол — рост производства 15–20% в год. Всего в мире в 2005 году произведено 42 млн. т, в том числе в Бразилии — 16 млн. т, в США и Канаде — 17 млн. т. Возник бум строительства заводов по биоэтанолю. В США строятся 33 новых завода общей мощностью 7 млн. т, в странах Евросоюза планируется к 2010 г. увеличить мощности по производству биоэтанола на 7 млн. т, в Китае строятся 100 новых заводов, среди них крупнейшие в мире мощностью 300 000 дал./сутки (1 млн. т в год). По мнению экспертов, в перспективе биоперерабатывающие заводы будут играть для экономики не меньшую роль, чем сегодня играют нефтеперерабатывающие заводы. Помимо энергетических и экологических аспектов производство биоэтанола рассматривается как значимый фактор развития сельскохозяйственных (как правило, депрессивных) регионов.

Биодизель (биотопливо на основе растительных масел). Здесь также реализуется мощнейшая программа, во многом аналогичная биоэтанолю. Для выполнения этой программы ежегодно осваиваются миллионы гектаров под масличные культуры, внедряются новейшие агротехнологии. Сформирован огромный рынок (спрос) на эту продукцию.

При производстве биотоплива одновременно решается и другая важнейшая проблема — обеспечение белковыми кормами животноводства.

Следует отметить наличие этической проблемы, особенно в странах третьего мира, еще не решивших проблему голода: использование пищевого сырья для индустриальных нужд. В этой связи принимаются решения использовать для производства биотоплива непищевую биомассу. Такой подход начал осуществлять Китай.

**Химия.** Две конкурирующие тенденции: микробиологический синтез или переработка биомассы. Сегодня более успешно производство на основе микробиологического синтеза. Уже 12 важнейших химических субстанций (1,3-пропандиол, молочная, лимонная, трегулоновая кислоты и др.) получают в промышленных масштабах

с помощью микробиологического синтеза. С помощью биокатализа налажены промышленные производства полиакриламида, стероидных гормонов и др.

**Бионанотехнология** — важнейшая часть биотехнологии. Основные направления приложения — энергетика (топливные элементы), информатика (нанобиопроцессоры), медицина (биочипы, системы направленного транспорта лекарств и др.), сельское хозяйство, экология, безопасность, новые материалы. Бионанотехнология является сильным стимулом развития науки и образования, выступает интегратором передовых достижений целого ряда смежных наук. Имеются госпрограммы развития бионанотехнологий в США, Китае, Индии, Евросоюзе, еще в 10 странах такие программы создаются. Активно обсуждаются этические аспекты применения достижений бионанотехнологий.

**3. Возможности для России.** От России в форуме «БИО-2006» участвовала большая делегация — свыше 40 человек, сформированная при поддержке МНТЦ. От Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова был командирован его вице-президент Р.Г. Васильев. Была предоставлена возможность принять участие во всех мероприятиях, получить наиболее полную информацию. Анализ этой информации, встречи и переговоры позволяют сделать следующее заключение.

Сегодня у России имеется уникальная возможность не только включиться в «биотехнологическую гонку», но и стремительно продвинуться вперед и войти в группу лидеров по основным направлениям «прорыва». Этому способствуют: высокий образовательный и научно-технологический потенциал; наличие ключевых факторов для развития микробиологической промышленности — дешевой энергии, пресной воды, возможностей для интенсивного развития сельского хозяйства, обширная территория; благоприятная экономическая конъюнктура. По совокупности этих параметров наша страна имеет наиболее благоприятные условия для развития биотехнологической промышленности по таким направлениям, как биотопливо, микробиологический синтез, химия на основе возобновляемого сырья. Состоявшийся в Москве буквально через несколько дней после конгресса «БИО-2006» международный конгресс по биоэтанолю (более 250 участников) продемонстрировал возможность развития данного направления в России. Это же касается и другого «прорывного» направления — бионанотехнологии. Здесь важнейшими факторами успеха могут служить высокий уровень отечественной биологической науки и образования, развитие нанотехнологий в целом и информатики.

Следует отметить роль международной кооперации в сфере биотехнологии, в которой наша страна могла бы участвовать в полной мере. Для этого существует взаимная заинтересованность, что было отмечено в сводном информационном томе конгресса «БИО-2006».

Для использования указанной возможности необходимо срочно решить ряд проблем. Биотехнология должна быть признана (на деле, а не на словах) государственным приоритетом. Необходима государственная программа поддержки биотехнологии. Она должна включать, среди прочего, принятие ряда законодательных актов (в частности, по биотопливу), проведение скоординированной работы различных федеральных ведомств (Минэкономразвития, Минобрнауки, Минпромэнерго, Минсельхоз, Минздравсоцразвития и др.) по осуществлению перспективных биотехнологических проектов, создание соответствующих инвестиционных и венчурных фондов, поддержку создания региональных программ развития биотехнологии. При этом необходимо в максимальной степени использовать наработки Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, создавшего Национальную программу развития биотехнологии в Российской Федерации на 10-летний период, а также других организаций, представляющих отечественную биотехнологическую науку и промышленность.

Принятие и реализация этих мер позволят в кратчайшие сроки (3–5 лет) получить существенные экономические и социальные результаты. Среди них: резкое изменение ситуации в аграрном секторе — только на программу по биотопливу можно активно задействовать не менее 5 млн. га из ныне заброшенных 22 млн. га пахотных земель, создать сотни тысяч рабочих мест на селе, внедрить современные агротехнологии. Возможно создание новой (топливной и химической) агроиндустрии с объемом рынка не менее 3–5 млрд. долларов в ближайшие 5–10 лет. Получат ощутимый стимул для развития и традиционные сферы сельского хозяйства: животноводство — в результате получения достаточного количества высококачественных кормов, — и растениеводство как следствие улучшения севооборота и внедрения современных агротехнологий. В результате будут решены и ключевые задачи продовольственной программы, обеспечение импортозамещения важнейших видов продовольствия. Внедрение биотоплива и прогрессивных биотехнологий в промышленность и жилищно-коммунальное хозяйство позволит существенно улучшить экологическую ситуацию, особенно в крупных городах и мегаполисах, эффект от которого — оздоровление населения — будет измеряться миллиардами рублей. Медицинские аспекты

в еще большей степени будут связаны с разработкой и внедрением новейших средств диагностики и лечения с применением достижений бионанотехнологии. В Европе прогнозируемый рынок этой продукции оценивается к 2012 году в 4–8 млрд. евро, в России он может составить 200–500 млн. евро. Важнейшим же результатом развития бионанотехнологий является существенное улучшение качества отечественного здравоохранения, здоровья и благополучия граждан. Наконец, еще одно важное следствие развития отечественной биотехнологии — мощный толчок для развития образования и науки в целом, совершенствования инновационной системы. Таким образом, приложив усилия к развитию биотехнологии, наше государство сделает решающий шаг в построении экономики, основанной на знаниях, обеспечении своей конкурентоспособности в условиях глобализации.

### **Международный конгресс «Топливный биоэтанол-2006»**

**20 апреля 2006 г.** в Москве состоялся Международный конгресс «Топливный биоэтанол-2006». Организаторы: Российская биотопливная ассоциация совместно с компанией «Гененкор Интернэшнл» при поддержке Государственной Думы ФС РФ, Министерства сельского хозяйства РФ, Министерства промышленности и энергетики РФ, Министерства экономического развития и торговли РФ, Российского зернового союза, Общества биотехнологов России, Ассоциации делового центра «Агро-ЭкоПрогноз». В Конгрессе приняли участие более 300 человек. С докладами выступили 15 человек. Присутствовал значительный журналистский корпус (более 30 лиц). Мероприятие имеет первый порядковый номер и планируется в будущем как регулярное (очередной второй Конгресс намечается в 2007 г.).

Цель Конгресса — привлечь внимание бизнес-общества к проблеме производства топлива (биоэтанола) из возобновляемого сырья. Россия еще только находится на пути к решению этой проблемы, тогда как весь мир прошел достаточный путь.

Основные вопросы, которые обсуждались на Конгрессе:

- Мировой рынок этанола: состояние и перспективы.
- Биозаводы и их роль в развитии биоэкономики.
- Политика государства по стимулированию производства биотоплива.
- Производство этанола: технологии гидролиза и ферментации, сырье.

- Как производителям зерна получать добавочную прибыль, производя биоэтанол для внутренних рынков?
  - Позиция нефтяных и автомобильных компаний по использованию биоэтанола.
  - Новые ферментные технологии.
  - Производство биоэтанола: экономика производства, процессы и энергетика.
  - Как перестроить спиртзавод на производство биоэтанола?
  - Рынок этанола и вторичных продуктов его производства (барда, клейковина, глютен).
  - Рынок зерна для производства этанола.
  - Финансирование проектов.
  - Будущее биотоплива (производство этанола из биомассы).
  - Производство этанола: что необходимо учесть при строительстве биозаводов.
  - Другие актуальные для индустрии темы.
- Сайт Конгресса: [www.biotoplivo.ru](http://www.biotoplivo.ru)

## **VII Международный Форум «Высокие технологии XXI века»**

**24–27 апреля 2006 г.** в Москве состоялась конференция VII Международного Форума «Высокие технологии XXI века». Организатор мероприятия – Российский фонд развития высоких технологий (РФРВТ). В рамках конференции 26 апреля прошло секционное заседание «Формирование и реализация приоритетных проектов в области биотехнологии». Председательствовали на нем заместитель директора Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, академик РАН А.И. Мирошников, депутат Государственной Думы Федерального Собрания РФ А.А. Губкин, вице-президент Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, профессор Р.Г. Васильев. Было заслушано 14 докладов. Из них несколько докладов вызвали особенный интерес аудитории.

Так, например, профессор Е.Г. Борисенко с коллегами из Московского государственного университета пищевых производств (МГУПП) предоставили материалы об инновационных биотехнологиях в производстве продовольствия, основанные на анализе современного состояния проблемы в мире и собственных разработках. Сущность предложенных сотрудниками МГУПП технологий сводится к использованию дрожжей-суперпродуктов биомассы, отселектированных из нормальных биоценозов ягод, фруктов, молочнокислых продуктов.

Исходным сырьем для дрожжевой биоконверсии служат зерно колосовых культур (шелушенное, дробленое), зерновой солод. В результате получают в большом объеме биологически ценные субстраты пищевого и кормового назначения с высоким содержанием белка, богатого незаменимыми аминокислотами, витаминными группами В, РР и др. Производство дрожжевых функциональных продуктов разрешено Минздравсоцразвития России под торговой маркой «Фервیتال» и Минсельхозом России – под торговой маркой «Фервистим».

В сообщении А.С. Яненко (ГосНИИгенетика) сделан акцент на приоритеты отечественной промышленной биотехнологии. К их числу автор относит следующее:

- глубокую переработку углеводородного сырья с целью получения широкого спектра химикатов;
- комплексную переработку зерна;
- получение мономеров для полимерной химии с помощью ферментации сахаросодержащего сырья и биоконверсии углеводов (биокатализ).

В.Н. Даниленко (консорциум «Биомак») привлек внимание к актуальности для Российской Федерации организации конкурентоспособного производства субстанций антибиотиков. Он считает целесообразным для реализации этого проекта создать Биотехнологический Холдинг. В качестве перспективных продуцентов автор предлагает разработанные Научно-исследовательским центром биотехнологии антибиотиков «БИОАН» авермектин и эритромицин. Подчеркивается, что получение указанных препаратов проводилось на базе штаммов *Streptomyces avermitilis* и *Saccharopolyspora erythraea*, геномы которых недавно полностью секвенированы.

Доклад А.Р. Аблаева (компания «Genencor International») был посвящен биоэтанолу и перспективам развертывания его производства в России. При этом был дан полный анализ нынешней ситуации по странам и континентам. Пока лидирующие позиции по производству и потреблению биоэтанола занимают Северная и Южная Америка. Есть прогресс и в странах ЕС. Следует отметить, что в указанных регионах мира производство биоэтанола находит государственную поддержку.

Возможности оригинальной отечественной разработки для производства глюкозных сиропов продемонстрировали Ю.А. Рамазанов с соавт. (ЗАО «Саяны», Новосибирск). Они использовали опытно-промышленную установку с безградиентным газо-вихревым биореактором собственной конструкции, что позволяет увеличивать выход сахаристых веществ при ферментативном гидролизе крахмала.

В.К. Савенко (ЗАО «Экстрасиб», Томск) основан на концепции создания биотехнологических производств на базе спиртовых заводов, которую планируется провести в жизнь в рамках целевой региональной программы развития биотехнологии Томской области.

Обобщающий доклад «Перспективные проекты федерального и регионального уровней в Национальной программе «Развитие биотехнологии в Российской Федерации на 2006–2015 гг.» сделал вице-президент Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, профессор Р.Г. Васильев. Он на конкретных примерах проанализировал наиболее разработанные и подготовленные к реализации подпрограммы и проекты указанной комплексной программы. В частности, речь шла о ряде региональных подпрограмм (Киров, Саратов), целевых проектах по морской биотехнологии, биотопливу и др.

Сайт Форума: [www.hitechno.ru](http://www.hitechno.ru)

### **Научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биобезопасности»**

**1–2 июня 2006 г.** в Санкт-Петербурге прошла Научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биобезопасности». Она была организована Обществом биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Российским научно-практическим обществом эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Российским обществом гигиенистов, Национальным союзом медико-биологической защиты, Автономной некоммерческой образовательной и просветительской организацией «Жизнь без инфекций», Ассоциацией врачей-инфекционистов Санкт-Петербурга и Ленинградской области, НИИ гриппа РАМН при поддержке Государственной Думы ФС РФ, Правительства г. Санкт-Петербурга, Северо-Западного отделения РАМН, Северо-Западного НИЦ РАСХН, Российской Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова.

В работе конференции приняли участие более 100 специалистов в области микробиологии, эпидемиологии, биотехнологии, сельского хозяйства, представители органов исполнительной власти, руководители научных обществ и ассоциаций по указанным профилям. Участников конференции приветствовали представители исполнительных органов г. Санкт-Петербурга. В адрес

конференции пришло приветствие от первого вице-спикера Государственной Думы ФС РФ О.В. Морозова.

Главная цель конференции состояла в экспертной оценке и выработке научно обоснованной позиции по проблеме биобезопасности и противодействия биотерроризму. Эта проблема приобретает все большую актуальность и требует объединения усилий государственных и общественных организаций на национальном и международном уровнях.

Участники конференции констатировали, что реальности современного мира выдвигают в число приоритетов биологические проблемы — сохранение биоразнообразия, экологического равновесия, а в последнее время — такие острые вопросы, как обеспечение биобезопасности и противодействия биотерроризму. Следует отметить, что на передний план выходит борьба с инфекционной патологией, приобретающей глобальный характер в виде пандемий вирусных или иных заболеваний.

В этой связи ведущие общественные организации России по профилю эпидемиологии и микробиологии, осознавая важность указанной проблемы для сохранения человечества, пришли к согласованному мнению о целесообразности создания Международной коалиционной программы обеспечения биобезопасности и противодействия биотерроризму. Одним из активных генераторов этой идеи был покойный академик РАМН А.А. Воробьев, президент Общества биотехнологов России, до 1 марта 2006 г. — заместитель академика-секретаря Отделения профилактической медицины РАМН, известный специалист в данной области, который незадолго до смерти выступил с инициативой проведения настоящей конференции (конференция была посвящена его памяти).

Учитывая такое значимое для международной жизни событие, как совещание «Большой восьмерки», проводимое в июле 2006 г. в России, участники конференции в качестве итогового документа выработали и обсудили проект меморандума-обращения к Правительству Российской Федерации. Участники конференции надеются, что руководители нашего государства, которые в последнее время проводят работу по созданию федеральной программы по биологической и химической безопасности, используют разработанный документ при представлении материалов к заседанию «Большой восьмерки».

В результате обсуждения научных, методических, организационных и иных аспектов проблемы биобезопасности конференция **ПРИНЯЛА РЕШЕНИЕ:**

1. Обратиться к Правительству Российской Федерации с ходатайством о целесообразности разработки Международной коалиционной программы обеспечения



биобезопасности и противодействия биотерроризму и вручить ему соответствующий меморандум-обращение (текст данного документа, подписанный уполномоченными лицами, прилагается).

2. Считать целесообразным доведение материалов и итогового документа конференции до сведения РАН, РАМН, РАСХН и других научных и общественных организаций.
3. Учитывая большой личный вклад покойного академика РАМН А.А. Воробьева в означенную проблему и в развитие отечественной биотехнологии, с целью увековечения его памяти обратиться к Обществу биотехнологов России с предложением осуществить следующие меры:
  - создать Биотехнологический научный центр имени А.А.Воробьева;
  - издать избранные труды ученого;
  - учредить стипендию его имени для последипломного образования специалистов в области биотехнологии.

## МЕМОРАНДУМ-ОБРАЩЕНИЕ

к Правительству Российской Федерации

«Об организации глобальной системы биобезопасности и противодействия биотерроризму»

В связи с возрастанием роли международного сотрудничества в решении таких глобальных проблем, как терроризм, национальная рознь, экология и т.д., важно своевременное, научно обоснованное, организационно оформленное принятие мер на государственном уровне. За последние годы действенным инструментом такого сотрудничества стала деятельность «Большой восьмерки». Учитывая, что в нынешнем году заседание «Большой восьмерки» проводится в России, принимающая страна должна занять активную позицию по наиболее актуальным вопросам.

Мы, представители ведущих общественных организаций России в сфере биотехнологии, микробиологии, эпидемиологии, специально собравшиеся в Санкт-Петербурге на Научно-практической конференции «Актуальные проблемы биобезопасности» с целью всестороннего обсуждения проблемы биобезопасности в современных условиях, констатируем следующее.

Реальности наступившего столетия ставят перед человечеством крайне сложные проблемы. Вместе с нарастанием груза нерешенных вопросов в области экологии и демографии возникла в глобальном масштабе угроза терроризма, в том числе ее разновидности

— биотерроризма. Биологические агенты в качестве вредящего фактора могут действовать как в режиме преднамеренных диверсий или военных акций, так и в режиме несанкционированного распространения особо опасных инфекций или латентных, скрыто протекающих заболеваний.

Возможны и варианты антропогенного воздействия на природу в целом — имеются в виду недостаточно проверенные биологические эксперименты на растениях, животных, микроорганизмах. Природа раскрыла человеку еще не все тайны, и в будущем возможно появление новых вредоносных биологических агентов в естественных условиях.

Недавно мир уже столкнулся с подобными примерами: письма с возбудителями сибирской язвы, распространение вируса атипичной пневмонии (SARS), угроза пандемии птичьего гриппа (H5N1). Одна отдельно взятая страна сейчас не может только собственными силами обезопасить свое население. Поэтому встает задача создания глобальной международной системы биобезопасности и превентивного противодействия биотерроризму.

Между тем ни в России, ни за рубежом пока не создано такой системы на государственном и общественном уровнях. В связи с этим необходимо объединить усилия всех стран по формированию этой системы, принять ряд политических, организационных, экономических и специальных противоэпидемических мер и, прежде всего, прийти к согласованной позиции (вплоть до уровня ООН) по разработке Международной коалиционной программы обеспечения биобезопасности и противодействия биотерроризму. В этой программе должны быть предусмотрены:

1. Усиление действенного контроля над коллекциями особо опасных микроорганизмов и работами с ними.
2. Организация международного резерва (фонда) средств и способов защиты от биологических агентов (индикационных, диагностических, профилактических, лечебных и иных средств).
3. Развертывание научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ по созданию новейших или недостающих средств защиты от особо патогенных агентов.
4. Формирование международных сил быстрого реагирования, подготовленных для работы в инфекционных очагах.
5. Налаживание оперативной связи и надежного обмена информацией о случаях инфекционных заболеваний в различных странах и регионах земного шара.



6. Создание международной базы данных и экспертно-аналитической группы по координации работ в сфере биобезопасности.
7. Реализация образовательных и просветительских программ по данной проблеме.

Следует иметь в виду, что создание международной системы биобезопасности и противодействия биотерроризму повысит уровень противоэпидемической готовности для борьбы со случаями естественно возникающих и распространяющихся инфекционных болезней.

Международная программа может опираться на соответствующие базовые национальные программы, которые уже имеются в ряде стран и которая в настоящее время формируются в России в соответствии с Постановлениями Правительства от 9 февраля 2005 г. № 64 и от 16 мая 2005 г. № 303.

Учитывая вышеизложенное, мы обращаемся к Правительству Российской Федерации выйти с инициативой к лидерам «Большой восьмерки» о формировании указанной международной программы, используя при этом свой политический и административный ресурс с максимальным привлечением общественных структур в качестве экспертов и исполнителей. Именно тесное взаимодействие государственных и общественных организаций может создать эффективную глобальную систему биобезопасности и противодействия биотерроризму.

По поручению участников научно-практической конференции:

Вице-президент Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова Р.Г. Васильев,

Председатель Российского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов Б.Ф. Семенов,

Председатель Общества гигиенистов и санитарных врачей Е.Н. Беляев,

Президент Национального союза медико-биологической защиты В.И. Покровский,

Директор Автономной некоммерческой образовательной и просветительской организации «Жизнь без инфекций» Б.Л. Черкасский,

Президент Ассоциации врачей-инфекционистов Санкт-Петербурга и Ленинградской области Ю.В. Лобзин.

*2 июня 2006 года*

*г. Санкт-Петербург,*

*Российская Федерация*

### **Круглый стол «Живые системы: оценка нынешнего состояния и перспективы развития»**

**2 июня 2006 г.** в Москве состоялся круглый стол «Живые системы: оценка нынешнего состояния и перспективы развития». Организаторы: Министерство образования и науки Российской Федерации, Федеральное агентство по науке и инновациям, Фонд «Центр экономических исследований и распространения экономической информации «Открытая экономика». Присутствовало более 100 человек, из них около 50 экспертов из разных учреждений и регионов страны. Председательствовали: статс-секретарь — заместитель министра образования и науки РФ Д.В. Ливанов, заместитель руководителя Федерального агентства по науке и инновациям И.П. Биленкина, исполнительный директор Центра «Открытая экономика» А.И. Гордеев.

Цель инициаторов собрания — выяснить точки зрения ведущих специалистов в области физико-химической биологии и биотехнологии на перспективы развития данного научного направления в нашей стране, в том числе на использование программно-целевого метода по типу федеральных программ по информатизации и нанотехнологиям.

Состоялся обмен мнениями о путях развития отечественных исследований в сфере живых систем и биотехнологии. Выступило более 20 человек, из них: уже упомянутые Д.В. Ливанов, И.П. Биленкина, А.И. Гордеев, проректор МГУ им. М.В. Ломоносова, декан и заведующий кафедрой биоинженерии биологического факультета, академик РАН М.П. Кирпичников, директор Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, академик РАН В.Т. Иванов, директор ТИБОХ ДВО РАН, академик РАН В.А. Стоник, директор Центра «Биоинженерия» РАН, академик РАСХН К.Г. Скрябин, президент группы компаний «Биопроцесс» М.А. Могутов, первый вице-президент РАМН, ректор ММА им. И.М. Сеченова, академик РАН и РАМН М.А. Пальцев, академик-секретарь Отделения биологических наук РАН, директор Института медико-биологических проблем, академик РАН и РАМН А.И. Григорьев, вице-президент РАСХН, академик РАСХН Л.К. Эрнст, руководитель Центра высоких технологий «ХимРар» А.А. Иващенко, директор Института биологии гена РАН, академик РАН Г.П. Георгиев, вице-президент Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, профессор Р.Г. Васильев, декан химического факультета Санкт-Петербургского

государственного университета, профессор А.Ю. Библибин, декан факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, член-корреспондент РАН и академик РАН В.А. Ткачук, директор ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН, академик РАН А.И. Арчаков, директор ГосНИИ генетики член-корреспондент РАН и академик РАСХН В.Г. Дебабов, директор Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, академик РАН Д.С. Павлов, заместитель директора по науке Всероссийского НИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН, член-корреспондент РАН Б.Ф. Ванюшин, сотрудник Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАН, д.б.н., профессор РАН Ф.Л. Киселев и др. Позиции многих выступавших совпадали, поскольку приоритет биологии для XXI века ни у кого не вызывал сомнений. Несколько разнились подходы в зависимости от интересов того или иного ученого или руководителя. Все сходились на том, что требуется долговременная солидная поддержка со стороны государства и в отношении развития фундаментальной науки, и инвестиций в прикладные проекты, как это принято в развитых странах (информация о круглом столе имеется также на сайте [http://www.scienceref.ru/client/doctrine.aspx?ob\\_no=2809&print=1](http://www.scienceref.ru/client/doctrine.aspx?ob_no=2809&print=1)).

По материалам круглого стола были приняты рекомендации.

## РЕКОМЕНДАЦИИ (проект)

### *1. Конституирующая часть*

Обсудив состояние и перспективы исследований и разработок в области живых систем и биотехнологии, участники круглого стола отмечают следующее.

Науки о жизни и биотехнологии играют ключевую роль в обеспечении национальной безопасности и конкурентоспособности страны. В экономически развитых странах науки о жизни и биотехнология являются национальным приоритетом, характеризующимся концентрацией интеллектуальных, научных, технологических и финансовых ресурсов, промышленным протекционизмом. Эти направления важны с точки зрения укрепления национальной безопасности и повышения экономической конкурентоспособности страны.

В Российской Федерации биотехнология и науки о жизни в целом развиваются в русле мировых тенденций, в стране имеются авторитетные научные школы и организации, работающие на мировом уровне. Но, во-

первых, их количество весьма ограничено, во-вторых, сложившаяся система организации и контроля работ по данным направлениям в целом далека от эффективной. Не существует стратегии развития данных критических направлений, что приводит к неэффективному расходованию государственных средств, проблемам в формировании целостных инновационных цепочек, сложностям в реализации механизмов частно-государственного партнерства.

С учетом складывающейся в России экономической ситуации можно говорить о перспективе существенного увеличения государственных ассигнований в данные области и осуществлении перехода от политики сохранения научного потенциала к достижению прорыва в создании новых биотехнологий. Однако необходимо избежать распыления ресурсов, отдавая приоритет в финансировании наиболее результативным организациям и научным группам.

### *II. Рекомендательная часть*

В целях обеспечения эффективного развития в России такого приоритета, как «Живые системы», включающего в себя науки о жизни и биотехнологии в целом, участники круглого стола рекомендуют:

Для максимально полной реализации российского потенциала в области приоритетного направления «Живые системы» разработать совместными усилиями научного сообщества, представителей деловых кругов и представителей органов власти Федеральную целевую программу на 2008–2015 гг. в предметной области (далее Программа). Эта Программа должна включать в себя:

- анализ реального состояния всех сегментов российских биотехнологий и наук о жизни, формирование постоянно действующих экспертных панелей по выработке направлений и механизмов дальнейшего развития;
- перечень конкретных приоритетов, целей и задач Программы, а также механизмов и процедур внесения корректив по ходу реализации Программы;
- детальное описание механизмов реализации Программы, включая описание механизмов управления, регламенты экспертизы проектов и результатов проектов в рамках Программы, инфраструктуры и источников финансирования;
- механизмы развития практики формирования среднесрочных (срок реализации 3–5 лет) комплексных проектов, включающих всю «инновационную цепочку» от генерации новых знаний до создания на их основе новых технологий, продуктов, услуг;

- конкретные механизмы государственно-частного партнерства, предложения и план по совершенствованию нормативно-правовой базы такого партнерства;
- план совершенствования системы подготовки научных кадров в области биологии и биотехнологии, с приоритетом на создание научно-образовательных центров на базе ведущих научно-исследовательских организаций и вузов.

**6–8 июня 2006 г.** в Санкт-Петербурге состоялся Международный симпозиум «ЕС – Россия: перспективы сотрудничества в области биотехнологии в 7-й рамочной программе». Помимо научной программы в рамках симпозиума с 5 по 9 июня работала Международная школа-конференция молодых ученых «Биотехнология будущего». В работе школы-конференции приняло участие 60 молодых ученых более чем из 10 регионов РФ, стран СНГ и Европы.

**13–17 июня 2006 г.** в Казани состоялась VIII Международная конференция «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана».

**19–21 июня 2006 г.** в Пущино прошла Третья международная конференция из серии «Наука и бизнес» – «Международное сотрудничество в биотехнологии: Перспективы и реальность». Вышел в свет сборник материалов конференции, в котором отражены основные достижения зарубежных и российских ученых в таких областях, как биотехнология, биомедицина, биотехнология защиты окружающей среды, коммерциализация научных разработок, трансфер технологий, подготовка специалистов современных биотехнологических производств, международные стандарты (GLP, GMP, ISO-9000), экспорт/импорт биологических материалов.

## ПУБЛИКАЦИИ

*Крик Ф. Жизнь как она есть: ее зарождение и сущность / Пер. с англ. – М.: URSS, 2005. – 160 с.*

**Аннотация.** Книга известного английского физика и биохимика Френсиса Крика, лауреата Нобелевской премии в области физиологии и медицины (1962), посвящена одной из самых больших тайн природы: зарождению жизни. Автор предлагает и обосновывает необычную гипотезу внеземного происхождения жизни: направленной панспермии. Материал излагается в

свободной и интересной манере, с большим количеством примеров. В книге 15 глав (времена и расстояния, большие и малые; космическая мистерия; единообразие биохимии; сущность жизни; нуклеиновые кислоты и молекулярная репликация; первозданная Земля; статистическое заблуждение; другие подходящие планеты; высшие цивилизации; как давно могла зародиться жизнь?; что они могли послать?; конструкция ракеты; противопоставление двух теорий; возвращаясь к вопросу Ферми; почему это должно нас волновать?), эпилог, приложение. Эта книга, несомненно, будет интересна широкому кругу читателей: биологам, химикам, биофизикам и просто тем, кто интересуется тайнами природы.

*Алексеев В.И., Каминский В.А. Прикладная молекулярная биология. Изд.2. – М.: URSS, 2005. – 200 с.*

**Аннотация.** В учебном пособии изложены основы молекулярной биологии, а также направления приложения закономерностей молекулярной биологии для практического использования. Рассмотрены системная организация живого вещества на биосферном и молекулярном уровнях, структурная организация макромолекул, функции биополимеров, их комплексов и основные направления практического использования молекулярной биологии. Пособие предназначено для студентов естественных вузов – будущих биологов, химиков, технологов пищевых производств, а также аспирантов, преподавателей и специалистов.

*Пул Ч., Оуэнс Ф. Нанотехнологии / Пер. с англ. Изд.2. – М.: URSS, 2005. – 328 с.*

**Аннотация.** Первое руководство на русском языке, описывающее структуру и свойства наноматериалов от твердотельных до биологических объектов. Исчерпывающе изложены технологии изготовления и методы исследования наноструктур, разнообразные применения – от оптоэлектроники до катализа и биотехнологий. Учебник-монография адресован широкому кругу научных работников, инженеров-электронщиков, специалистов в областях химических и биотехнологий.

*Biological science and biotechnology in Russia: controlling diseases and enhancing security. – The National Academies Press, 2005. – 156 p.*

**Резюме.** В обзоре, озаглавленном «Биологическая наука и биотехнология в России: контроль заболеваемости и повышение безопасности», предлагается ряд рекомендаций, которые могли бы помочь России объединиться вместе с Соединенными Штатами и широким международным сообществом в проведении глобальных действий по контролю над инфекционными заболеваниями. Предложенная двусторонняя межправительственная комиссия могла бы сыграть ключевую роль, чтобы обоюдное взаимодействие обратило от односторонней поддержки в партнерство. В обзоре предлагается учредить два модельных Государственных центра санитарно-эпидемиологического надзора в России, более сосредоточенных на поддержке отобранных на конкурсной основе российских научно-исследовательских групп как центров превосходства, на поощрение инвестиций в ниши биотехнологии российских компаний и на расширении возможностей молодым ученым достигать лидирующих позиций в России. Кроме того, в обзоре особо отмечается важность программ США, которые поддерживают интеграцию ученых бывшего СССР, работавших в оборонной сфере, с гражданскими исследователями, не вовлекавшимися в военную деятельность.

*Meksem Khalid. The handbook of plant genome mapping: genetic and physical mapping. — Wiley-VCH, 2005. — 402 p.*

**Резюме.** Несмотря на полное секвенирование геномов модельных организмов, например, бактерий, дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), червей (*Caenorhabditis elegans*), дрозофилы (*Drosophila melanogaster*), мыши, человека, расшифровка геномов растений пока отстает. К настоящему времени секвенированы два вида растений: модельный объект — *Arabidopsis thaliana* и зерновой вид — рис (*Oryza sativa*). Хотя в разработке находятся геномы нескольких зерновых видов. Между тем секвенирование растений имеет важное прикладное значение для сельского хозяйства, равно как и фундаментальное значение для понимания таких вопросов, как синтения и биоразнообразие в целом. В книге ставится задача привлечь внимание к проблеме картирования генома растений.

*Plunkett Jack W. Plunkett's biotech and genetics industry almanac 2006. — Plunkett Research, Ltd, 2005. — 562 p.*

**Резюме.** Книга является справочным пособием в области бизнеса в биотехнологии, генетике, протеомике и смежных отраслях. В ней содержатся сведения о ведущих биотехнологических компаниях (около 450), о современных тенденциях в развитии генетики, технологий, статистики, финансов, приводятся глоссарий и указатели. В книге содержатся рубрики: краткая история биотехнологии; состояние биотехнологической индустрии сегодня; финансирование и инвестиции в биотехнологию; патенты; биотехнологическая деятельность в Сингапуре и Китае; Управление по контролю над продуктами и лекарствами США (FDA); генотерапия; персонализированная медицина; системная биология; разработка лекарств; клинические испытания; дискуссия о ценах на лекарства; исследования стволовых клеток; терапевтическое клонирование; нанотехнология регенеративной медицины; сельскохозяйственная биотехнология; системы поставки лекарств; проект «HarMap» (International Project HarMap, <http://www.harmap.org>), проект «Биощит» (Project BioShield, <http://www.whitehouse.gov/infocus/bioshield>); этические вопросы.

*Sasson A. Medical biotechnology: achievements, prospects and perceptions. — United Nations University Press, 2006. — 154 p.*

**Резюме.** Рассматриваются последние достижения и перспективы развития медицинской и фармацевтической биотехнологии. Анализируются различные аспекты этого направления, такие как биоиндустрия и биоэкономика, вопросы управления, наиболее привлекательные для бизнеса области и инновационные решения, медицинская и фармацевтическая биотехнология в развивающихся странах в условиях глобализации, этические проблемы, социальное восприятие биотехнологии и др.

*BioWorld Biotechnology State of Industry Report 2006. — BioWorld Online, 2006. — 429 p.*

**Резюме.** В книге — годовичном обзоре BioWorld — прослежена динамика развития биоиндустрии в текущем году и исследованы тенденции в 2006–2007 гг. В ней содержатся четыре раздела:

1. Анализ — перспективы и прогнозы экспертов по промышленности из Уолл-стрит, Вашингтона и академий.
2. Финансовые данные — данные годовой стоимости первичного размещения акций (IPO), венчурного капитала, грантов и т.д.



3. Корпоративные сделки — детали сотрудничества и соглашений между биотехнологическими, фармацевтическими и агробизнес-компаниями.
4. Разработка биотехнологической продукции — продукция в разработке, утвержденная в США и за океаном и внесенная в список лицензированных на применение.

(Более подробно см. сайт <http://www.mindbranch.com/products/R528-18.html>)

*Biodefense Market Report 2006: Vaccines, Therapeutics and Diagnostics for Bioterror Agents. — BioWorld Today, 2006. — 237 p.*

**Резюме.** Материалы по биозащите подготовлены консалтинговой фирмой BioAbility и напечатаны BioWorld Online. Даны базовые сведения о потенциальных агентах биотерроризма: бактериях, вирусах, токсинах — возбудителях таких заболеваний, как сибирская язва, ботулизм, натуральная оспа, болезни Эбола и Марбурга, вирусные энцефалиты, 19 других групп патогенов, идентифицированных Центром контроля заболеваний (CDC). Приведены справочные таблицы о различных вакцинах, диагностических и лечебных средствах для предотвращения и борьбы с указанными заболеваниями в случае их возникновения. Перечислены компании, занятые на рынке таких препаратов.

(См. сайт <http://www.bioworld.com/servlet/com.accumedia.web.Dispatcher?next=bioDefenseMarket>)

*BioWorld Top 25 Biotechnology Drugs Report. — BioWorld, 2006. — 192 p.*

**Резюме.** Представлен обзор о 25 биотехнологических препаратах, наиболее перспективных на этом рынке. Анализ проведен по ряду ключевых параметров, таких как категория, показания, описание заболевания, хронология разработки, патентная защита, конкурирующие препараты, протекционизм на ближайшую перспективу и т.д. Был критериальный отбор по следующим условиям: препарат должен быть утвержден в пределах последних 20 лет, полная стоимость на биотехнологическом и фармацевтическом рынке, выручка и др. Лекарства охватывают наиболее важные нозологии — рак, диабет, инфекционную патологию, болезни крови и др.

(См. сайт [http://www.ahcpub.com/products\\_and\\_services/?prid=502&spcid=0,2&mtid=6&catid=0&pdr=0&clnr=0&clnt...](http://www.ahcpub.com/products_and_services/?prid=502&spcid=0,2&mtid=6&catid=0&pdr=0&clnr=0&clnt...))

Анонсированное в томе 1, № 2 за 2005 год журнала «Вестник биотехнологии ...» третье издание «Basic Biotechnology» вышло в июне 2006 г. (см. ниже).

*Basic Biotechnology. 3<sup>rd</sup> Ed. / Ed. by C. Ratledge, B. Kristiansen. — Cambridge University Press, 2006. — 682 p.*

**Резюме.** Книга состоит из 25 глав, сгруппированных в 2 части: 1) «Основы и принципы», 2) «Практическое применение». Фундаментальные аспекты излагаются в первых 11 главах, в которых освещены такие проблемы, как общественное восприятие биотехнологии, стойхиометрия и кинетика роста микробов, анализ генома прокариот, генная инженерия дрожжей и волокнистых грибов, биореакторы, масс-перенос и др. Один из редакторов — Colin Ratledge — написал здесь главу «Биохимия и физиология роста и метаболизма», а другой редактор — Bjorn Kristiansen — проанализировал значение экономики для биотехнологии. В главах 12–25 второй части книги обсуждены практические вопросы. Рассматриваются такие темы, как биотехнологический бизнес, биотехнология ферментов, аминокислот, органических кислот, рекомбинантных белков и др. Уделяется также внимание экологическим вопросам, биотрансформациям, биотехнологии растительных клеток, иммунохимии.

*Комиссаров Г.Г. Фотосинтез: физико-химический подход. Изд. 2, стереот. — М.: URSS, 2006. — 224 с.*

**Аннотация.** Подробно обосновывается предложенная автором (1995) принципиально новая концепция фотосинтеза. Согласно ей, источником кислорода (водорода) при фотосинтезе служит не вода, а пероксид водорода экзо- и эндогенного происхождения. Убедительно показана необходимость участия в фотосинтезе тепловой энергии, введено представление о локальном разогреве хлоропласта. Новая концепция фотосинтеза позволила предложить экологически чистый принцип преобразования солнечной энергии, объяснить неудачную кислородную динамику в «Биосфере-2», выдвинуть новый подход к стимулированию роста и развития растений. Обсуждены также следствия, вытекающие из концепции (связь фотосинтеза и дыхания, возможность нового подхода к объяснению формирования атмосферы Земли), затронут вопрос о происхождении жизни и др. Коротко рассмотрена история изучения фотосинтеза, его значение. Приведены этапы многолетних

(1960–2001) работ автора по физико-химическому моделированию природных фотосинтетических систем (обоснование фотоэлектрохимической гипотезы фотосинтеза, создание первой в мире функциональной модели хлоропласта и др.). Значительное место в книге занимает изложение экспериментальных и теоретических данных, полученных в лаборатории фотобионики Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН при изучении механизма генерации тока в пленках фотосинтетических пигментов и их аналогов. Приведена классификация трех типов фотовольтаических эффектов в пленках органических полупроводников, контактирующих с электролитом. Форма изложения книги позволяет читателю выборочно (по отдельным главам) знакомиться с материалом. Книга адресована химикам, физикам, биологам, а также студентам и аспирантам этих специальностей, интересующимся проблемой фундаментального и уникального биологического процесса — фотосинтеза.

*Суздаев И.П. Нанотехнология: физико-химия нанокластеров, наноструктур и наноматериалов. Серия «Синергетика: от прошлого к будущему». — М.: URSS, 2006. — 592 с.*

**Аннотация.** Книга включает круг вопросов, которые могут составить область науки о нанобъектах, процессах и явлениях, проходящих на уровне размеров 1–100 нм. В этой области наблюдаются эффекты, чувствительные как к отдельным атомно-молекулярным уровням энергии, так и к коллективным свойствам тел. Развитие науки о нанокластерах и наносистемах и методов их исследования привело к созданию нанотехнологии, наноматериалов и наноустройств, отличающихся уникальными свойствами и перспективами применения. Книга представляет собой попытку соединения теоретических и экспериментальных данных о нанокластерах и наносистемах с некоторыми вопросами более общего, вводного характера: методами исследования нанокластеров и поверхности твердого тела и микроскопическими и термодинамическими подходами к изучению нанокластеров и поверхности. Такая структура книги нашла свое отражение благодаря работам автора в Институте химической физики им. Н.Н. Семенова РАН и чтению курса лекций по физико-химии нанокластеров и наноструктур в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, на факультете наук о материалах. Книга может быть полезной как для студентов и аспирантов, так и для

научных работников, ведущих исследования или начинающих работать в области нанотехнологий.

*Золотов Ю.А., Иванов В.М., Амелин В.Г. Химические тест-методы анализа. Изд. 2. — М.: URSS, 2006. — 304 с.*

**Аннотация.** Монография посвящена химическим тестам, которые широко используются в экологической, промышленной, клинической, криминалистической сферах и обеспечивают возможность простого и недорогого качественного, полуколичественного или количественного анализа. Обсуждены общие характеристики тест-систем: дефиниции, достоинства тестов, их химические основы, изготовление и особенности технических средств, методология использования. Детально описано применение экспресс-тестов во многих областях, указаны разнообразные тест-средства. Библиография насчитывает 691 ссылку, книга включает 89 обобщающих таблиц. Монография рассчитана на специалистов в области химического анализа, экологии, криминалистики, медицины и может быть полезна студентам и аспирантам химических вузов.

*Рогожин В.В. Практикум по биологической химии. — М.: URSS, 2006. — 256 с.*

**Аннотация.** Рекомендовано Учебно-методическим объединением вузов РФ по образованию в области зоотехнии и ветеринарии для студентов вузов в качестве учебно-методического пособия по специальностям 310700 — Зоотехния и 310800 — Ветеринария. Основной целью практикума является ознакомление студентов с практическими методами биохимических исследований, закрепление теоретических знаний в области биологической химии, развитие экспериментальных навыков и привитие научного мировоззрения.

*Шамин А.Н. История биологической химии: Формирование биохимии. Серия «Из наследия А.Н. Шамина». Изд 2-е. — М.: URSS, 2006. — 264 с.*

**Аннотация.** Книга посвящена истории формирования классической биохимии в период с середины XIX в. до 20-х гг. XX в., становлению исследований белков, углеводов, липидов, биокатализаторов, основного обмена веществ, истокам биоэнергетики, открытию и изучению гормонов, витаминов, нуклеиновых кислот. В ней прослежено возникновение основных концепций биохимии, уточнение ее предмета.

Шамин А.Н. *История биологической химии: Истоки науки. Серия «Из наследия А.Н. Шамина».* Изд 2-е. — М.: URSS, 2006. — 392 с.

**Аннотация.** Книга посвящена первым шагам взаимодействия химии с биологией и медициной. В ней впервые дано систематическое изложение истории возникновения биологического эксперимента, использованного для изучения методами химии биологических объектов и процессов. Отдельная глава посвящена появлению биохимии в России, первым биохимическим трудам, учебникам и научным учреждениям, где проводились биохимические исследования.

*Review of the Department of energy's genomics: GTL program.* — *The National Academies Press, 2006.* — 102 p.

**Резюме.** Департамент энергетики (ДЭ) США продвигает научную и технологическую инновацию с целью обеспечения прогресса в национальной, экономической и энергетической безопасности Соединенных Штатов. Осознавая потенциал микроорганизмов для создания новых альтернативных источников энергии и ремедиации экологических загрязнений, ДЭ в 2000 г. выступил с инициативой формирования программы «Геномы — жизни» (ныне называется «Геномика»), или сокращенно «GTL» (от «Genomes to Life»). В программе ставится цель способствовать прогностической оценке микробных систем, которые можно будет использовать для создания инженерных устройств для производства биоэнергии и очистки окружающей среды, а также выяснению процессов обмена и накопления углерода. В настоящей работе проводится критический анализ программы и ее инфраструктуры. В целом делается вывод, что программа «GTL» состоялась и обещает дать много научных решений, которые обеспечат достижение ее целей. Однако текущий план ДЭ по созданию четырех независимых блоков для производства белка, построения молекулярных изображений,

протеомного анализа и системной биологии может стать не самым рентабельным, эффективным и оптимальным с научной точки зрения путем, чтобы обеспечить эту инфраструктуру. В качестве альтернативы в работе предлагается сформировать четыре институтоподобных структуры, каждая из которых интегрировала бы мощности всех четырех из первоначально запланированных производств и сфокусировалась бы на одной или двух главных задачах программы «GTL». Альтернативная инфраструктура могла бы иметь особенно высокую научную ценность, потому что потребность в технологиях будет непосредственно связана с биологическими задачами программы.

*The Impact of Globalization on Infectious Disease Emergence and Control: Exploring the Consequences and Opportunities, Workshop Summary — Forum on Microbial Threats / S. Knobler, A. Mahmoud, S. Lemon (Eds).* — *The National Academies Press, 2006.* — 246 p.

*Microbial Threats to Health: The Threat of Pandemic Influenza / M.S. Smolinski, M.A. Hamburg, J. Lederberg (Eds).* — *The National Academies Press, 2006.* — 48 p.

*Ensuring an Infectious Disease Workforce: Education and Training Needs for the 21<sup>st</sup> Century — Workshop Summary / S.L. Knobler, Th. Burroughs, A. Mahmoud, S.M. Lemon (Eds).* — *The National Academies Press, 2006.* — 238 p.

*Addressing Foodborne Threats to Health: Policies, Practices, and Global Coordination, Workshop Summary.* — *The National Academies Press, 2006.* — 304 p.

*Implications of Genomics for Public Health: Workshop Summary / Lyla Hernandez (Ed.).* — *The National Academies Press, 2006.* — 98 p.

## ПРЕДСТОЯЩИЕ МЕРОПРИЯТИЯ 2006 ГОДА

### КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ

**20–21 сентября 2006 г.** в Москве состоится симпозиум «Биобезопасность микробиологических ресурсов», который проводят Организация по экономическому сотрудничеству и развитию (ОЕСД) и Российская Федерация. Цель симпозиума — привлечь внимание к проблеме обеспечения безопасности при работе с опасными биологическими агентами. В работе симпозиума будут принимать участие известные специалисты и эксперты в данной области из России и США, Великобритании, Канады, Германии, Франции, Италии, Бельгии.

Справки на сайте: [www.oecd.org/sti/biotechnology](http://www.oecd.org/sti/biotechnology)

**25–27 сентября 2006 г.** в Кливленде (штат Огайо, США) состоится форум «BIO Mid-America VentureForum». Основное внимание уделяется экономическим аспектам биотехнологии. В работе форума будут участвовать более 50 фирм.

Справки на сайте: <http://bma.bio.org/opencms/bma/2006/index.jsp>

**24–25 октября 2006 г.** в Москве будет проходить Международный конгресс «Биодизель-2006». Организатор — Российская биотопливная ассоциация при поддержке Государственной Думы ФС РФ, Министерства сельского хозяйства РФ, Министерства промышленности и энергетики РФ, Министерства экономического развития и торговли РФ, Российского

зернового союза, Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова.

Справки на сайте: [www.bioplivo.ru](http://www.bioplivo.ru)

**13–15 ноября 2006 г.** в Москве состоится круглый стол «Биологическая безопасность» в рамках Международного форума «Проблемы природно-техногенной безопасности», организаторами которого являются Российская академия наук и Общественная палата РФ при поддержке Правительства Российской Федерации. Руководитель круглого стола — академик-секретарь Отделения биологических наук, директор Института медико-биологических проблем РАН, академик РАН и РАМН А.И. Григорьев, заместитель руководителя — вице-президент Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, профессор Р.Г. Васильев. С докладами выступят ведущие специалисты в данной области: академик РАН и РАМН А.И. Григорьев, член-корреспондент РАН, академик РАСХН В.Г. Дебабов, академик РАМН О.И. Киселев, академик РАН Е.Д. Свердлов, академик РАН С.Г. Инге-Вечтомов, академик РАМН А.Л. Гинцбург, профессор В.Н. Даниленко, член-корреспондент РАН Л.В. Калакуцкий, академик РАМН В.А. Тутельян, академик РАСХН И.А. Тихонович, академик РАСХН А.Н. Панин, Н.Т. Васильев, профессор Д.Н. Кавтарадзе, профессор Р.Г. Васильев.

Справки: 119991 Москва, Ленинский проспект, 32А. Агентство научных и деловых коммуникаций при РАН Тел.: (495) 938-18-51, 938-18-61. E-mail: [safetyforum@conference.ras.ru](mailto:safetyforum@conference.ras.ru)



1. Рукописи статей и других материалов представляются в редакцию на бумажном носителе (формат А4) или в электронном виде (на дискете или по электронной почте с обязательным уведомлением).
2. Текст набирается в Microsoft Word, шрифт — Times New Roman, размер шрифта — 12, межстрочный интервал — полуторный. Размещение на листе формата А4 со стандартными полями. Кроме текста статьи, добавляются краткие сведения об авторе (ах): Ф.И.О., место работы, должность, научные степень и звание, адрес для переписки и факсимильной и электронной связи).
3. Объем рукописи: оригинальные статьи — не более 12 — 14 стр. (в среднем 22000 знаков без пробела), не более 25 цитированных авторов; обзоры — не более 20 — 24 стр. (в среднем 40000 знаков без пробела), список литературы — не более 50 авторов. Требования к композиции рукописи: 1) оригинальные статьи — УДК, название, автор (ы), место работы, резюме на русском и английском языках, ключевые слова, введение, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение (выводы), литература, список сокращений; 2) краткие сообщения и обзоры строятся в виде сплошного текста, без вышеуказанных рубрикации, со списком литературы, но без резюме; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде в формате TIF или JPEG. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале — литература на русском языке, затем — на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные установки (Index Medicus и др.).
6. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.

7. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.
8. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.
9. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном материале авторов.
10. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.
11. Адрес редакции указан на титульном листе журнала.
12. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию. Подписка на журнал в течение 2006 года проводиться не будет.

## ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР) создано в 2003 г., зарегистрировано Минюстом РФ.

Главными целями деятельности ОБР являются:

- содействие развитию биотехнологии в России как приоритетного направления научно-технического прогресса, основы повышения уровня жизни и благосостояния ее граждан;
- содействие сохранению научного и научно-технологического потенциала биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, достижению приоритета российской науки;
- обеспечение обмена научными идеями и научно-техническими достижениями, передовым производственным опытом;
- содействие развитию сотрудничества ученых, инженеров, специалистов с мировым научным и общественно-политическим сообществом;
- создание условий для творческой работы, роста профессионализма и компетентности, более полного использования интеллектуального потенциала членов организации в интересах развития науки и производства.

Для достижения этих целей ОБР осуществляет различные мероприятия, в том числе проводит конференции, симпозиумы, рабочие совещания. Ежегодно проводится съезд Общества биотехнологов России.

Издается журнал «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» совместно с Информационно-аналитическим центром медико-социальных проблем.

ОБР имеет отделения в 50 регионах России и объединяет свыше 1000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

ОБР тесно сотрудничает с Союзом биотехнологов и другими общественными и государственными организациями, научными и образовательными учреждениями по профилю.

Основной организационной деятельностью ОБР являются региональные отделения, тесно взаимодействующие с Центральным Правлением и секциями (экспертными группами).

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

*Контакты: Адрес: 119296 Москва, Университетский пр-т, 9*

*Тел.: 8-915-179-51-92*

*E-mail: obr@biorosinfo.ru; www.biorosinfo.ru*