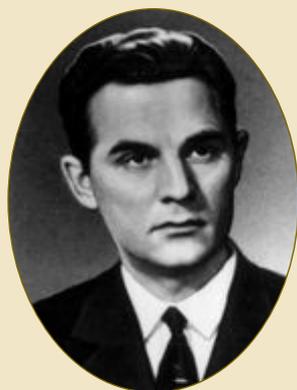


· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

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

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



Т. 2, № 3

2006

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

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРТ ·

2006, Т. 2, № 3

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 Росохранкультуре
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.Василов* 4

Оригинальные статьи

Особенности амплификации нуклеотидных последовательностей оперонов *glnA* и *glnB* *Acholeplasma laidlawii* РС8 при диссоциации популяции клеток в культуре микоплазмы.

В.М. Чернов, Ю.В. Гоголев, Н.Е. Мухаметшина, Т.Н. Нестерова, О.А. Чернова 5

Изучение возможности использования отходов производства нуклеиновых кислот (денуклеотизированных дрожжей) в качестве кормовых добавок.

Ю.С. Аликин, В.П. Клименко, В.И. Масычева, Т.А. Терещенко, В.А. Фадина, И.А. Ленивкина, Д.В. Кропачев, К.Я. Мотовилов, Н.С. Хрусталева 12

Сравнительное изучение специфических свойств препаратов на основе дсРНК.

Ю.С. Аликин, В.И. Масычева, Г.М. Левагина, Е.Д. Даниленко, В.А. Фадина, Е.Ю. Рослякова, Г.М. Игнатъев, С.И. Прудников, Т.М. Прудникова, А.А. Духовский 21

Метод рестрикционного анализа геномов млекопитающих *in silico*.

М.А. Абдурашитов, В.Н. Томилов, В.А. Чернухин, Д.А. Гончар, С.Х. Дегтярев 29

Сравнительный рестрикционный анализ хромосомной ДНК крысы *in vitro* и *in silico*.

В.А. Чернухин, М.А. Абдурашитов, В.Н. Томилов, Д.А. Гончар, С.Х. Дегтярев 39

Краткие сообщения

Индукция ферментов глиоксилатного цикла в органах крысы при иммобилизационном стрессе.

И.Г. Моргунов, С.В. Камзолова, Т.В. Финогенова, А. П. Соколов, С. П. Кузнецов, Н. И. Федотчева, М.В. Захарченко, М.Н. Кондрашова 47

Обзоры

Состояние коллекций микроорганизмов в России.

С.М. Озерская, Г.А. Кочкина, Н.Е. Иванушкина, К.М. Запрометова, С.С. Еремина, Е.В. Князева 51

О создании федеральной программы по направлению «Морская биотехнология».

Г.В. Маслова 62

Страницы истории

Макс Дельбрюк — путь от физики к биологии: к 100-летию со дня рождения и 25-летию со дня смерти.

В.С. Воробьев 68

Юбилейные и знаменательные даты 2006 года 78

Хроника

События первого—второго полугодия 2006 года 80

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

Features of amplification of nucleotide sequences in *rrnA* and *rrnB* operons of *Acholeplasma laidlawii* PG8 at dissociation of cell populations in mycoplasma culture.

V.M. Chernov, Ju.V. Gogolev, N.E. Muhametshin, T.N. Nesterov, O.A. Chernova 5

The study of the possibility of using nucleic acid production wastes food (denucleotized yeasts) as feed additives.

Yu. S. Alikin, V.P. Klimenko, V.I. Masycheva, T. A. Tereshchenko, V.A. Fadina, I.A. Lenivkina, D.V. Kropachev, K.Ya. Motovilov, N.S. Khrustaleva 12

The comparative study of specific properties of the preparations based on dsRNA.

Yu.S. Alikin, V.I. Masycheva, G.M. Levagina, E.D. Danilenko, V.A. Fadina, E.Yu. Roslyakova, G.M. Ignatyev, S.I. Prudnikov, T.M. Prudnikova, A.A. Dukhovskiy 21

Method of restriction analysis of the mammals genomes in silico.

M.A. Abdurashitov, V.N. Tomilov, V.A. Chernukhin, D.A. Gonchar, S.Kh. Degtyarev 29

Comparative restriction analysis of the rat chromosome DNA cleavage in vitro and in silico.

V.A. Chernukhin, M.A. Abdurashitov, V.N. Tomilov, D.A. Gonchar, S.Kh. Degtyarev 39

Short communications

Induction of the glyoxylic acid cycle enzymes in rat organs under immobilized stress.

I.G. Morgunov, S.V. Kamzolova, T.V. Finogenova, A.P. Sokolov, S.P. Kuznetsov, N.I. Fedotcheva, M.V. Zaharchenko, M.N. Kondrashova 47

Reviews

The state of collections of microorganisms in Russia.

S.M. Ozerskaja, G.A. Kochkina, N.E. Ivanushkina, K.M. Zaprometova, S.S. Eremina, E.V. Knyazev 51

About forming of the Russian federal program «Marine biotechnology».

G.V. Maslova 62

Pages of history

Max Delbrueck — path from physics to biology: to centenary from the date of birth and 25th anniversary of his death.

V.S. Vorobyev 68

Anniversary and significant dates 2006 78

The chronicle

Events of the first-second half-year 2006 80

The information

Forthcoming actions 2006 85

Rules for authors 86

К читателям

Третий номер журнала за 2006 год посвящен 100-летию со дня рождения и 25-летию со дня смерти выдающегося молекулярного биолога Макса Дельбрюка. В связи с этим помещена подробная статья о жизни и деятельности ученого.

Такая дата обязывала бы к специальной комплектации работ по отобранной тематике. Однако редколлегия выдерживает обычный принцип построения журнала, хотя некоторые работы попадают в русло научных интересов М. Дельбрюка. Так, например, в статье казанских исследователей (Чернов В.М. и др.) представлены данные об амплификации нуклеотидных последовательностей оперонов рРНК для выявления и идентификации микоплазмы, продемонстрировав тем самым, какие возможности открывает современная молекулярная генетика. Это же относится и к двум работам авторов из Новосибирска (С.Х. Дегтярев с коллегами) о рестрикционном анализе хромосомной ДНК млекопитающих, которые продолжают серию целенаправленных публикаций сотрудников НПО «СибЭнзим» в нашем журнале. Эти научные изыскания наглядно показывают высочайший уровень химического конструирования генома и демонстрируют тот прогресс, который достигнут за 70 лет после знаменитой публикации М. Дельбрюка с Н.В. Тимофеевым-Ресовским и К.Г. Циммером о природе мутаций и структуре гена (1935). Заслуживает внимания в этом плане и работа С.М. Озерской с соавторами о состоянии коллекций микроорганизмов в России, что важно для установления полноценного международного сотрудничества, чему всегда способствовал Макс Дельбрюк.

Статья Г.В. Масловой дает представление о такой актуальной области, как морская биотехнология. В ней четко обозначены проблемы и перспективы данного направления.

Выпускаемый номер журнала характеризует и другой момент, связанный с уходом из жизни известного вирусолога и биотехнолога, академика РАН Льва Степановича Сандахчиева, который, помимо исполнения многих других обязанностей, являлся также вице-президентом Общества биотехнологов России и членом редакционного совета журнала «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова». В этой связи наряду с некрологом публикуются работы его новосибирских коллег и учеников (Аликин Ю.С. и др.).

В целом тематику очередного номера журнала можно считать достаточно интересной и полезной.

**Главный редактор,
и.о. президента Общества биотехнологов России,
профессор Р.Г. ВАСИЛОВ**

УДК: 576.3

ОСОБЕННОСТИ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ОПЕРОНОВ *rtnA* И *rtnB* *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* PG8 ПРИ ДИССОЦИАЦИИ ПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ МИКОПЛАЗМЫ

В.М. ЧЕРНОВ*, Ю.В. ГОГОЛЕВ, Н.Е. МУХАМЕТШИНА, Т.Н. НЕСТЕРОВА, О.А. ЧЕРНОВА

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН

Амплификация спейсеров 16S-23S *rtnA* и *rtnB* оперонов рРНК клеток *A. laidlawii* PG8 имеет особенности. При диссоциации популяции клеток в культуре микоплазмы в неблагоприятных условиях роста, вызванной активным превращением вегетативных форм клеток микоплазмы в ультрамикрорформы, может наблюдаться аттенуация ПЦР-сигнала в отношении нуклеотидных последовательностей спейсера 16S-23S *rtnA*, если в качестве матрицы используется ДНК без ферментативной депротенинизации. При этом у ультрамикрорформ *A. laidlawii* PG8 происходит избирательная амплификация нуклеотидных последовательностей *rtnB* — не содержащего гены тРНК оперона рРНК, тогда как у вегетативных клеток в этих условиях наблюдаются «равные» ПЦР-сигналы в отношении амплифицируемых последовательностей оперонов рРНК — содержащего (*rtnA*) и не содержащего (*rtnB*) гены тРНК микоплазмы. В случае использования в качестве матрицы ДНК, обработанной протеиназой К, амплификация тестируемых последовательностей *rtnA* и *rtnB* у ультрамикрорформ «выравнивается» и соответствует таковой у вегетативных форм клеток микоплазмы. Примененный способ ПЦР для амплификации нуклеотидных последовательностей *rtnA* и *rtnB* *A. laidlawii* PG8 может быть эффективным методом выявления диссоциации популяции клеток культуры микоплазмы и обнаружения в природных источниках как вегетативных форм клеток, так и ультрамикрорформ *A. laidlawii*.

Ключевые слова: опероны *rtnA* и *rtnB*, *Acholeplasma laidlawii*.

Микоплазмы — мельчайшие, наиболее просто организованные прокариотические организмы, способные к самостоятельному воспроизведению — имеют ограниченные биосинтетические способности, что определяет их зависимость от высших организмов. В процессе эволюции микоплазмы приспособились к тесному сосуществованию с клетками высших эукариот. В природе все микоплазмы являются факультативными паразитами или комменсалами животных и растений. Многие микоплазмы — возбудители болезней человека, животных и растений; основные контаминанты клеточных культур, в том числе используемых в биотехнологии для производства вирусных вакцин. При этом один и тот же вид микоплазм может колонизировать клетки тканей и человека, и животных, и растений. Такова «вездесущая» (ubiquitous) микоплазма *Acholeplasma laidlawii*, которую

выделяют из почвы и компоста, тканей человека, животных, насекомых, а также растений. Эта микоплазма является также одним из основных контаминантов клеточных культур.

Диагностика микоплазменных инфекций и контаминаций представляет проблему. Традиционные способы выявления бактерий (микробиологический, связанный с высевом на бесклеточные питательные среды, и серологический, основанный на выявлении антител) оказываются ненадежными вследствие особенностей биологии микоплазм. Идеальный метод выявления микроорганизмов предполагает высокую специфичность, простоту и быстроту в исполнении, а также возможность оценки множественности инфекции. В этой связи основные надежды экспресс-диагностики этих микроорганизмов связывают с использованием метода направленной амплификации (Борхсениус С.Н. и др., 2002) [1].

В настоящее время метод ПЦР, обеспечивающий амплификацию нуклеотидных последовательностей оперонов рРНК, широко используется для выявления и идентификации микоплазм, в том числе *A. laidlawii*, в различных образцах — клеточных культурах, тканях человека, животных, растениях, почвенных изолятах

* Автор для переписки:

© 2006 г. Чернов Владислав Моисеевич,
д.б.н., профессор, заместитель директора
Казанского института биохимии и биофизики КНЦ РАН
Тел.: 8 (8432) 92-73-44
E-mail: Chernov@mail.knc.ru

(Борхсениус С.Н. и др., 2002 [1]; Razin, Herrmann, 2002 [12]).

В геноме *A. laidlawii* присутствует 2 оперона генов рРНК микоплазмы — *gpnA* и *gpnB*, — каждый из которых включает гены для субъединиц 23S, 16S и 5S рРНК (Weisburg W.G. et al., 1989 [14]; Nakagawa T. et al., 1992 [10]; Kong F. et al., 2001 [9]). Оба оперона способны к экспрессии. Они расположены на удаленных друг от друга участках хромосомы и имеют некоторые различия, связанные с единичными заменами нуклеотидов. Кроме того, в спейсере оперона *gpnA* — между генами 16S и 23S рРНК — локализованы 2 гена тРНК — изолейцина и аланина. Сочетание консервативных и переменных участков 16S и 23S спейсеров оперонов рРНК определяет широкое использование нуклеотидных последовательностей этих областей в качестве родо- и видоспецифичных маркеров и диагностических зондов микроорганизмов (Kong F. et al., 2001) [9].

Недавно в наших исследованиях (Чернов В.М. и др., 2004; 2005) [6, 7] было установлено, что адаптация к неблагоприятным условиям роста культуры *A. laidlawii* PG8 связана с диссоциацией популяции клеток вследствие активного превращения вегетативных форм клеток в ультрамикроразмеры (наноклетки), обладающие морфологическими, ультрацитоструктурными и молекулярно-генетическими свойствами, отличными от таковых у типичных — вегетативных форм — клеток микоплазмы. В отношении некоторых амплифицируемых участков генома бактерий, переживающих неблагоприятные условия роста (в том числе ограничения по субстрату), обнаружен обратимый эффект аттенуации ПЦР-сигнала (Warner J.M., Oliver J.D., 1998) [13]. Поэтому проверка на возможную аттенуацию ПЦР-сигнала в отношении различающихся по первичной нуклеотидной структуре амплифицируемых областей спейсеров 16S-23S *gpnA* и *gpnB* оперонов *A. laidlawii* при диссоциации в популяции клеток культуры микоплазмы, возникающей в неблагоприятных условиях роста, представляется весьма актуальной. В связи с этим выяснение особенностей направленной амплификации нуклеотидных последовательностей спейсеров 16S-23S *gpnA* и *gpnB* оперонов клеток *A. laidlawii* PG8 при культивировании их в неблагоприятных условиях роста — ограничения по субстрату — явилось целью данной работы.

Материалы и методы

Acholeplasma laidlawii штамм PG8 был получен из коллекции микроорганизмов Института эпидемиологии

и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (Москва). Клетки *A. laidlawii* PG8 выращивали на модифицированной жидкой питательной среде Эдварда (Чернов В.М. и др., 2005) [7].

Для приготовления среды использовали ТПС, а также сыворотку лошадиной крови производства Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института (Казань), глюкозу (ОАО «Дальхимфарм», Хабаровск) и пенициллин (ОАО «Синтез», Курган).

Для индукции неблагоприятных условий роста культуры микоплазмы использовали метод ограничения субстрата (Романова и др., 1995). Из среды Эдварда исключали глюкозу, а также дрожжевой экстракт и культивировали клетки *A. laidlawii* PG8 на обедненной среде от 7 суток до 2 лет (Чернов В.М. и др., 2005) [7].

Для амплификации различающихся по первичной нуклеотидной структуре областей оперонов *gpnA* и *gpnB* *A. laidlawii* PG8 нами были сконструированы праймеры A16LF (5'-ggaggaaggtggggatgacgtcaa-3') и A23LR (5'-ccttaggagatggctctctatcttcaaac-3'), комплементарные фрагментам генов 16S рРНК и 23S рРНК микоплазм, фланкирующим спейсерную область рибосомного оперона, на основании опубликованных данных о последовательностях генов рРНК микоплазмы (Kong F. et al., 2001 [9]; Weisburg W.G. et al., 1989 [14]). Олигонуклеотиды были синтезированы в НПО «ЛИТЕХ» (Москва).

Полимеразную цепную реакцию проводили в реакционной смеси, в состав которой входили следующие компоненты: 5-кратный буфер (335 мМ трис-НСl, рН 8,8; 83 мМ (NH₄)₂SO₄; 12,5 мМ MgCl₂; 10,5% Twin 20; 0,5 мкг/мл желатина), смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, 1 мкл ДНК-матрицы (от 0,01 до 200 нг), 0,4 мкМ каждого праймера. Таq-полимеразу (НПО «ЛИТЕХ», Москва) добавляли в реакционную смесь непосредственно перед реакцией в концентрациях, рекомендуемых производителем. Конечный объем реакционной смеси составлял 30 мкл. Поверх реакционной смеси наслаивали 50–100 мкл минерального масла (Sigma, США). Денатурацию ДНК осуществляли при 95 °С в течение 5 сек., отжиг праймеров — при 61 °С (5 сек.), синтез новой цепи ДНК — при 72 °С в течение 20 сек. Режим реакции (28–32 цикла) контролировали с помощью амплификатора «Терцик» («ДНК-технология», Россия). В первом цикле время процесса денатурации увеличивалось до 30 сек. В последнем цикле время для реакции полимеризации (+72 °С) продлевалось до 60 сек., после чего включался режим хранения продуктов реакции (+10 °С).

Электрофоретическое разделение окрашенных бромистым этидием фрагментов ДНК проводили в агарозном геле (1–2%) и анализировали на приборе SE-2 («Хеликон», Россия) с источником питания «Эльф-2» («ДНК-технология», Россия) с помощью системы геледокументирования DNA Analyzer.

Результаты

Результаты направленной амплификации нуклеотидных последовательностей спейсерных зон 16S-23S *gtnA* и *gtnB* клеток *A. laidlawii* PG8, выращенных на полноценной среде Эдварда и при ограничении субстрата, представлены на рисунке 1.

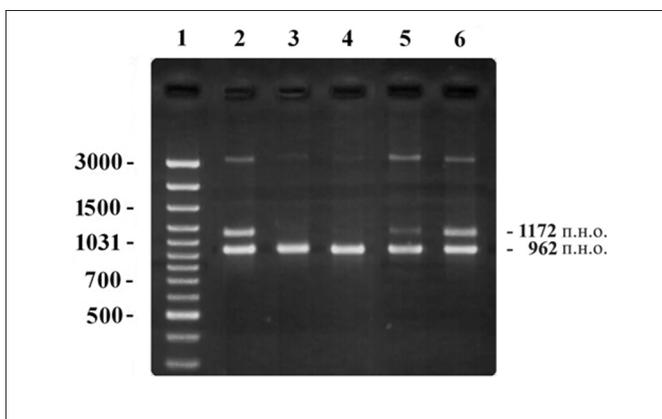


Рис. 1. Дифференциальная амплификация нуклеотидных последовательностей оперонов *gtnA* и *gtnB* клеток *A. laidlawii* PG8.

На дорожках 2–6 представлены продукты ПЦР ДНК клеток неадаптированной к неблагоприятным условиям роста культуры (2) и адаптированной (3, 4 – непролиферирующая культура после 90 и 480 дней «голодания», 5 – реверсирующая культура 1-й пассаж после «голодания» в течение 480 дней, 6 – активно пролиферирующая культура – 1-й пассаж после «голодания» в течение 480 дней) с праймерами A16LF и A23LR. На дорожке 1 представлен маркер длины фрагментов ДНК (в п.н.о.)

Очевидная дифференциальность амплификации – непропорциональность ПЦР-сигналов в отношении нуклеотидных последовательностей спейсеров 16S-23S *gtnA* и *gtnB* оперонов лизатов клеток, культивированных в неблагоприятных условиях роста культуры микоплазмы, отмечалась при использовании ДНК без специальной ферментативной депротенинизации в качестве матрицы в ПЦР со специфичными праймерами. В то же время в этих же условиях равное соотношение продуктов ПЦР в

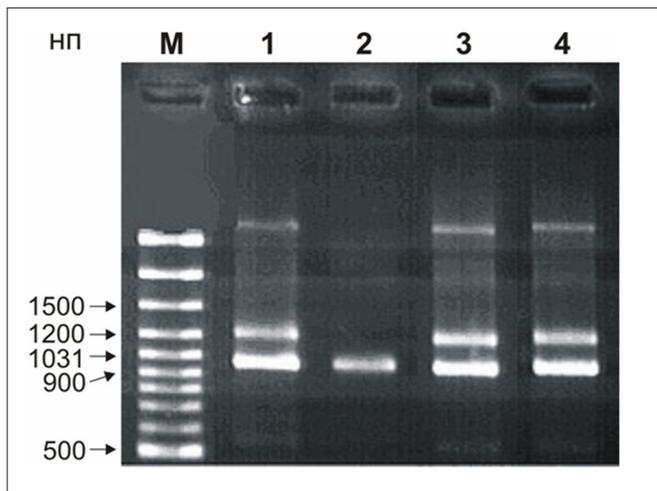


Рис. 2. Обратимость аттенуации амплификации нуклеотидных последовательностей *gtnA* оперона клеток *A. laidlawii* PG8.

На дорожках 1–4 представлены продукты ПЦР (с праймерами A16LF и A23 LR) ДНК клеток адаптированной (1, 2) и неадаптированной (3, 4) культур в случае ферментативной депротенинизации (1, 3) и ее отсутствия (2, 4). На дорожке М – маркер длины фрагментов ДНК в п.н.о.

отношении нуклеотидных последовательностей спейсеров 16S-23S *gtnA* и *gtnB* были получены при амплификации ДНК лизатов клеток микоплазмы, выращенных на полноценной среде Эдварда.

Ранее в наших исследованиях (Чернов В.М. и др., 2004, 2005) [6, 7] было показано, что популяции клеток *A. laidlawii* PG8, выращенных на полноценной среде Эдварда и культивированных в неблагоприятных условиях роста – при ограничении субстрата, различаются по соотношению вегетативных форм клеток и ультрамикрoформ микоплазмы.

Культура клеток *A. laidlawii* PG8, выращенных в неблагоприятных условиях роста, представлена главным образом ультрамикрoформами. Вегетативные формы и ультрамикрoформы имеют существенные морфологические, ультрацитоструктурные и молекулярно-генетические различия. Клетки этих двух субпопуляций могут быть выделены и очищены центрифугированием в градиенте плотности перкола (Чернов В.М. и др., 2005 [7]; Nishino T. et al., 2003 [11]). Результаты ПЦР (с праймерами A16LF и A23LR) препаратов ДНК клеток «легкой» фракции реверсирующей культуры (1-й пассаж на полноценной среде Эдварда после 480 суток культивирования клеток на среде с ограничением субстрата), соответствующей ультрамикрoформам, и

«тяжелой» фракции, соответствующей вегетативным формам клеток культуры микоплазмы, представленные на рисунке 2, свидетельствуют, что профиль электрофореграмм, относящихся к вегетативным формам клеток, соответствует теоретически ожидаемому наличию ампликонов обоих оперонов *gpnA* и *gpnB* *A. laidlawii* PG8, — характерному для «равной» амплификации. В то же время для ДНК ультрамикрoформ характерна избирательная амплификация «малого» оперона *pRНК* — *gpnB*. Нуклеотидная последовательность спейсера генов 16S и 23S «большого» оперона, — *gpnA* — ультрамикрoформ в аналогичных условиях ПЦР — использовании ДНК-матрицы без ферментативной депротеинизации — не амплифицируется. Однако в случае использования в качестве матрицы ДНК, обработанной протеиназой К, амплификация тестируемых последовательностей *gpnA* и *gpnB* у ультрамикрoформ «выравнивается» и профиль электрофореграммы (рис. 2) соответствует таковому для вегетативных форм клеток микоплазмы.

Обсуждение

Для выявления *A. laidlawii* в разных образцах специфичные праймеры, обеспечивающие направленную амплификацию нуклеотидных последовательностей оперонов *pRНК* в ПЦР, предложены Kong F. et al. (2001) [9]. Эти праймеры комплементарны нуклеотидным последовательностям 709–753 н.п.о. (5'-g...g-3') и 1042–1070 н.п.о. (5'-g...g-3'). Район отжига первого (прямого) праймера включает последовательность инсерции, поэтому амплификации подвергаются только последовательности «большого» оперона — *gpnA*. Это может быть препятствием для сравнительного анализа амплификации нуклеотидных последовательностей обоих оперонов *pRНК* *A. laidlawii* — *gpnA* и *gpnB*. В связи с этим нами были синтезированы праймеры, позволяющие амплифицировать нуклеотидные последовательности спейсерных зон *gpnA* и *gpnB*, а также примыкающих к ним областей, кодирующих участки генов 16S и 23S (рис. 3), которые и были использованы для выявления особенностей направленной амплификации нуклеотидных последовательностей спейсеров 16S и 23S *gpnA* и *gpnB* оперонов *A. laidlawii* PG8 в ПЦР при культивировании клеток микоплазмы на полноценной питательной среде Эдварда и на обедненной среде.

Клетки культуры *A. laidlawii* PG8, выращенной в неблагоприятных условиях роста, — ультрамикрoформы (размером менее 0,2 мкм) — имели морфологические, ультраструктурные и молекулярно-генетические свойства,

отличающие их от типичных (вегетативных форм) клеток *A. laidlawii* PG8 (Чернов В.М. и др., 2004) [6]. На твердой питательной среде ультрамикрoформы образовывали вместо типичных колоний микоплазмы — «яичница-глазунья» — специфичные микроколонии размером 50–300 мкм. Ультрамикрoформы обладали высокой

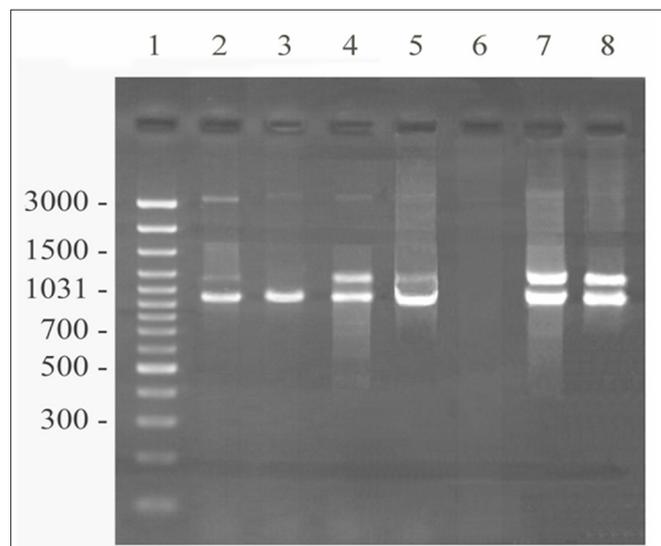


Рис. 3. Выявление вегетативных форм клеток и ультрамикрoформ *A. laidlawii* PG8 с помощью ПЦР в растениях — барвинка малого (*V. minor* L.).

На дорожках 2–5 представлены продукты амплификации (с праймерами A16LF и A23LR) ДНК растений, инфицированных клетками адаптированной (2, 3) и неадаптированной (4, 5) культур микоплазмы, полученные через 4 суток (2, 4) и 21 сутки (3, 5) после заражения клетками *A. laidlawii* PG8. На дорожках 6–8 представлены отрицательный (6) и положительный (7, 8) контроли — продукты ПЦР с ДНК (200 нг) неинфицированного растения (6), смеси ДНК (200 нг:10 нг) неинфицированного растения и клеток неадаптированной культуры *A. laidlawii* PG8, соответственно (7), а также ДНК (10 нг) клеток неадаптированной культуры клеток микоплазмы (8). На дорожке 1 представлен маркер длины фрагментов (п.н.о.).

жизнеспособностью, устойчивостью к стрессорным факторам и проявляли способность к реверсии в исходные вегетативные формы *A. laidlawii* PG8 при пассировании их на полноценной среде Эдварда. Превращение вегетативных форм клеток в ультрамикрoформы *A. laidlawii* PG8 обеспечивается существенной реорганизацией экспрессии генома микоплазмы (Чернов В.М. и др., 2005) [7].

В случае использования в ПЦР клеточной ДНК без специальной ферментативной депротеинизации на-

блюдалась аттенуация ПЦР-сигнала в отношении нуклеотидных последовательностей *gtnB* ультрамикрoформ. На электрофореграммах регистрировалась избирательная амплификация нуклеотидных последовательностей *gtnB* у клеток, выращенных в неблагоприятных условиях роста (см. рис. 1).

Показано, что феномен обратимой аттенуации — отмены амплификации ряда фрагментов генома — у бактерий при переходе в иные физиологические состояния, в том числе в неблагоприятных условиях роста, может быть связан с синтезом особых стрессорных белков, имеющих высокое сродство к ДНК (Зигангирова Н.А. и др., 2003 [2]; Kenji T. et al., 1998 [8]; Warner J.M., Oliver J.D., 1998 [13]). Образование комплексов таких белков с ДНК может определять изменения ее топологии и локальных матричных свойств ДНК, приводящих к феномену обратимой аттенуации, ПЦР сигнала в реакциях направленной амплификации нуклеотидных последовательностей, связанных с этими белками.

Локальные изменения ДНК матрицы затрудняют отжиг праймеров и присоединение полимеразы. Комплекс, образуемый этими белками с ДНК, не разрушается при фенольной экстракции, но оказывается чувствительным к обработке протеиназой К. Действительно, профиль полученных нами электрофореграмм (см. рис. 2) свидетельствовал, что амплификация нуклеотидных последовательностей *gtnA* и *gtnB* ультрамикрoформ выравнивается и соответствует таковой для ДНК вегетативных форм клеток микоплазмы при использовании в качестве матрицы в ПЦР ДНК, обработанной протеиназой К. Это позволяет предполагать, что дифференциальное ингибирование амплификации нуклеотидных последовательностей спейсерной области *gtnA* ультрамикрoформ *A. laidlawii* PG8 связано с присутствием в пробах термостабильных ДНК-связывающих полипептидов. При электрофоретическом разделении в ПААГ (18%) спиртовых осадков фенольных экстрактов клеток двух субпопуляций *A. laidlawii* PG8 стабильно выявлялись белки, различающиеся по молекулярной массе у клеток вегетативных форм (48, 34, 35 кДа) и у ультрамикрoформ (80, 37 кДа).

Таким образом, амплификация нуклеотидных последовательностей спейсеров 16S-23S *gtnA* и *gtnB* оперонов клеток *A. laidlawii* PG8 имеет особенности. При диссоциации популяции клеток в культуре микоплазмы в неблагоприятных условиях роста, вызванной активным превращением вегетативных форм клеток микоплазмы в ультрамикрoформы, может наблюдаться

аттенуация ПЦР-сигнала в отношении нуклеотидной последовательности спейсера 16S-23S *gtnA*, если в качестве матрицы используется ДНК без ферментативной депротенизации. При этом у ультрамикрoформ *A. laidlawii* PG8 происходит избирательная амплификация нуклеотидных последовательностей *gtnB* оперона рРНК, не содержащего гены тРНК микоплазмы. У вегетативных клеток в этих условиях наблюдаются «равные» ПЦР-сигналы в отношении амплифицируемых последовательностей обоих оперонов рРНК — содержащего (*gtnA*) и не содержащего (*gtnB*) гены тРНК микоплазмы.

Полученные нами данные позволяют считать, что использование в качестве праймеров специфичных нуклеотидных последовательностей спейсерной зоны 16S-23S *gtnA*, а в качестве матрицы ДНК — клеточных лизатов без специальной ферментативной депротенизации могут приводить к ложным заключениям относительно присутствия или отсутствия клеток *A. laidlawii* в исследуемых образцах.

Способность *A. laidlawii* образовывать в неблагоприятных условиях роста ультрамикрoформы (наноклетки), обладающие отличной от вегетативных форм клеток молекулярной и клеточной биологией, а также фитопатогенностью, определяет необходимость принципиально новых подходов к исследованию взаимодействия микоплазм с высшими организмами и контролю микоплазменных инфекций. Проверку любых образцов (в том числе клеточных культур и вакцинных препаратов) на контаминацию микоплазмами методом ПЦР следует проводить с учетом способности этих микроорганизмов к нанотрансформации в неблагоприятных условиях роста — превращению вегетативных клеток в ультрамикрoформы — наноклетки, обнаружение которых представляет серьезную проблему.

Ранее (Чернов В.М. и др., 1996; 1999) [4, 5] на основании данных электронной микроскопии нами было выдвинуто предположение, что развитие фитомикоплазмозов, вызываемых у растений *A. laidlawii*, связано с трансформацией вегетативных форм микоплазмы в ультрамикрoформы. Использование ПЦР с праймерами A16LF и A23LR для обнаружения микоплазмы в клетках растений на разных сроках инфекции подтвердили это предположение (см. рис. 3, взят из публикации в ДАН). Клетки *A. laidlawii* способны проникать в растения из почвы через неповрежденную корневую систему (Чернов В.М. и др., 1999 [5]; Серебрянникова Л.А., 2005 [3]). Почвенные изоляты *A. laidlawii* формируют на твердых питательных сре-

дах микроколонии, образуемые ультрамикроформами микоплазмы. Вероятно, ультрамикроформы являются распространенным состоянием клеток *A. laidlawii* в биоценозах. В этой связи эффективная диагностика, позволяющая выявлять в тестируемых образцах как вегетативные формы клеток, так и ультрамикроформы микоплазмы, представляется весьма актуальной.

Результаты проведенных нами лабораторных исследований свидетельствовали о специфичности этих праймеров — отсутствии ампликонов при использовании в ПЦР в качестве матрицы ДНК ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также растений и вытяжек черноземных и подзолистых почв. В результате анализа гомологии со случайными последовательностями нуклеотидов, представленных в банке данных GeneBank, было установлено, что праймеры A16LF и A23LR могут соответствовать родоспецифичным зондам в интервале расчетных температур отжига. Размеры амплифицирующихся при этом фрагментов ДНК могут быть использованы в качестве видоспецифичных маркеров *A. laidlawii*.

Таким образом, примененный нами способ ПЦР для амплификации нуклеотидных последовательностей *gpnA* и *gpnB* *A. laidlawii* РС8 может быть эффективным методом выявления диссоциации популяции клеток культуры микоплазмы и обнаружения в природных источниках как вегетативных форм клеток, так и ультрамикроформ *A. laidlawii*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 05-04-49435), ведущей научной школы (руководитель — академик И.А. Тарчевский), программы фундаментальных исследований РАН «Молекулярная и клеточная биология», а также государственного контракта № 02.442.11.7283.

Литература

1. Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вонский М.С. Микоплазмы: молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика. — СПб.: Наука, 2002. — 316 с.
2. Зигангирова Н.А., Бархатова О.И., Раковская И.В., Гинцбург А.Л. Влияние факторов внешней среды на экспрессию гена *Mycoplasma pneumoniae*, детерминирующего синтез белка адгезии P1 // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 2003. — 4. — С. 17–22.
3. Серебренникова Л.А. Почва как возможная среда обитания фитопатогенных микоплазм: Дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Л.А. Серебренникова; Моск. сельхоз. акад. — М., 2005. — 139 с.
4. Чернов В.М., Гоголев Ю.В., Попова Н.В., Чернова О.А. Инфицирование гороха посевного *Pisum sativum* клетками *Acholeplasma laidlawii* приводит к изменениям морфологических и физиологических признаков растений // Доклады РАН. — 1996. — Т. 348. — № 3. — С. 428–430.
5. Чернов В.М., Гоголев Ю.В., Попова Н.В., Чернова О.А. Генетическая изменчивость микоплазм (*Acholeplasma laidlawii*) при взаимодействии их с эукариотами (*Pisum sativum*) // Доклады РАН. — 1999. — Т. 369. — № 2. — С. 275–277.
6. Чернов В.М., Гоголев Ю.В., Мухаметшина Н.Е., Абдрахимов Ф.А., Чернова О.А. Адаптация микоплазм к биогенным и абиогенным стрессорам: нанотрансформация и мини-тела *Acholeplasma laidlawii* // Доклады РАН. — 2004. — Т. 396(3). — С. 417–420.
7. Чернов В.М., Мухаметшина Н.Е., Гоголев Ю.В., Абдрахимов Ф.А., Чернова О.А. Адаптивные реакции микоплазм *in vitro*: жизнеспособные, но некультивируемые формы и наноклетки *Acholeplasma laidlawii* // Микробиология. — 2005. — Т. 74(4). — С. 498–504.
8. Kenri T., Sasaki T., Kano Y. Identification and characterization of HU protein from *Mycoplasma gallisepticum* // Bioch. Bioph. Res. Comm. — 1998. — Vol. 249. — P. 48–52.
9. Kong F., James G., Gordon S., Zelynski A., Gilbert G. Species-specific PCR for identification of common contaminant mollicutes in cell culture // Applied and environmental microbiology. — 2001. — Vol. 67. — N 7. — P. 3195–3200.
10. Nakagawa T., Uemori T., Asada K., Kato I., Harasawa R. *Acholeplasma laidlawii* has tRNA genes in the 16S-23S spacer of the rRNA operon // J. Bacteriol. — 1992. — Vol. 174. — P. 8163–8165.
11. Nishino T., Nayak B.B., Kogure K. Density-dependent sorting of physiologically different cells of *Vibrio parahaemolyticus* // Applied and environmental microbiol. — 2003. — Vol. 69. — N 6. — P. 3569–3572.
12. Razin Sh., Herrmann R. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. — Plenum Publishers, N.-Y. — 2002. — 572 p.
13. Warner J.M., Oliver J.D. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of starved and viable but nonculturable *Vibrio vulnificus* cells // Appl. Envir. Microbiology. — 1998. — Vol. 64. — N 8. — P. 3025–3028.
14. Weisburg W.G., Tully J.G., Rose D.L., Petzel J.P., Oyaizu H., Yang D., Mandelco L., Sechrest J., Lawrence T.G., van Etten J.L., Maniloff J. and Woese C.R. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: Basis for their Classification // J. Bacteriol. — 1989. — Vol. 171. — P. 6455–6467.

**FEATURES OF AMPLIFICATION OF NUCLEOTIDE SEQUENCES
IN *rrnA* AND *rrnB* OPERONS OF *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* PG8
AT DISSOCIATION OF CELL POPULATIONS IN MYCOPLASMA CULTURE**

V.M. CHERNOV, Ju.V. GOGOLEV, N.E. MUHAMETSHIN,
T.N. NESTEROV, O.A. CHERNOVA

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
Kazan Research Center, Russian Academy of Sciences*

Thus, amplification of the 16S-23S spacer areas of the *Acholeplasma laidlawii* PG8 rRNA *rrnA* and *rrnB* operons has its own features. Attenuation of the PCR signal of nucleotide sequences of *rrnA* containing tRNA genes might be observed if DNA without enzyme deproteinization is used as a matrix. The phenomenon takes place due to dissociation of cell population caused by active entering vegetative cell forms into ultramicroforms in the mycoplasma culture at unfavorable growth conditions. DNA of *Acholeplasma laidlawii* PG8 ultramicroforms showed selective amplification of the *rrnB* nucleotide sequences – tRNA free rRNA operon as to vegetative cells, an «equal» PCR signals for the nucleotide sequences of *rrnA* and *rrnB* were registered. In this connection the use of specific nucleotide sequences of the *rrnA* spacer area as primers for PCR as well as the mycoplasma cell DNA without special enzyme deproteinization as a matrix may lead to wrong conclusions concerning the presence of *Acholeplasma laidlawii* in the tested samples.

Keywords: *rrnA* and *rrnB* operons, *Acholeplasma laidlawii*.

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ (ДЕНУКЛЕОТИЗИРОВАННЫХ ДРОЖЖЕЙ) В КАЧЕСТВЕ КОРМОВЫХ ДОБАВОК

Ю.С. АЛИКИН^{*}, В.П. КЛИМЕНКО¹, В.И. МАСЫЧЕВА¹, Т.А. ТЕРЕЩЕНКО¹, В.А. ФАДИНА¹,
И.А. ЛЕНИВКИНА², Д.В. КРОПАЧЕВ², К.Я. МОТОВИЛОВ², Н.С. ХРУСТАЛЕВА²

¹ *Институт медицинской биотехнологии ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», Бердск-10, Новосибирская область;*

² *Новосибирский государственный аграрный университет (НГАУ), Новосибирск*

Авторами разработаны денуклеотизированные дрожжевые кормовые добавки из отходов производства лекарственных препаратов на основе нуклеиновых кислот, содержащие маннанные олигосахариды. Определен состав пастообразной формы добавки — денуклеотизированный дрожжевой продукт (ДНДП). Исследована ее токсичность (при скармливании белым беспородным мышам в дозе 1 г/гол. в течение 10 дней). ДНДП был нетоксичен и стимулировал фагоцитоз перитонеальных макрофагов. Для изучения эффективности применения ДНДП в кормлении поросят-сосунов породы СМ-1 поставлен опыт на 50 головах, получавших добавку ежедневно дополнительно к основному рациону в дозе 0,3 г/кг. Скармливание поросятам ДНДП в течение 60 дней способствовало увеличению прироста их живой массы. Поросята, получавшие добавку, имели большую живую массу в 21-дневном возрасте на 8,7% и в 60-дневном возрасте — на 8,25%, чем контрольные животные. Добавление природных целлюлоз позволяет приготовить конечный продукт с хорошей рассыпаемостью и потому удобный для применения в птицеводстве, обозначенный как биостимулирующая кормовая добавка (БСКД). Использование БСКД в качестве кормовой добавки в ежедневном рационе цыплят-бройлеров в течение 52 дней в количестве 3% от основного рациона показало, что живая масса цыплят к концу опыта увеличилась на 6,6% по сравнению с контролем, а сохранность птицы возросла на 10,2%.

Ключевые слова: кормовые добавки, денуклеотизированные дрожжи, маннанные олигосахариды, животноводство, птицеводство.

Отходы производства препаратов биологически активных веществ (БАВ) микробиологического происхождения могут быть использованы для получения различных веществ: белков, липидов, витаминов и т.д. Разработка методов использования таких отходов позволяет создавать процессы безотходной технологии [1, 2]. Использование дрожжей при производстве БАВ дает уникальную возможность продемонстрировать данный подход.

Известно, что использование дрожжей в интенсивном откормочном животноводстве и птицеводстве перспективно. В этом направлении накоплен большой научный материал, характеризующий кормовые дрожжи как высокоценный источник протеина, углеводов, жиров и витаминов [3, 4].

В сельскохозяйственной практике в качестве кормовых добавок используются дрожжи кормовые (БК — паприн, эприн, гаприн) и гидролизные, а также их производные (гидролизаты и автолизаты), выпускаемые в виде порошка и гранул [3, 4, 5].

Вместе с тем при использовании таких кормовых средств при передозировках возникают серьезные осложнения, связанные с наличием в дрожжах нуклеопротеидов. Установлено, что из общего количества азота в дрожжах до 20% приходится на небелковый азот, содержащий 8–13% пуриновых, около 4% пиримидиновых оснований

** Автор для переписки:*

© 2006 г. Аликин Юрий Серафимович,
начальник отдела, Институт 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: alikiny@mail.ru

и 3% полисахаридов. Большое содержание нуклеиновых кислот в продукте вызывает нарушение пуринового обмена и проявляется у млекопитающих в появлении мочекаменной болезни почек, суставов (подагры). У птиц вызывает нарушение водно-солевого обмена, возникновение кандидозов, у рыб — нарушение функции печени. Это обстоятельство значительно ограничивает применение кормовых дрожжей [6]. Поэтому возможность удаления нуклеиновых кислот из дрожжей является перспективным методом расширения сферы их применения.

Существенным элементом современной технологии кормопроизводства является применение гидрофильных сорбентов (например, цеолитов), способствующих решению вопроса гигроскопичности целевого продукта, а также активации биологически активных веществ желудочно-кишечного тракта у животных.

Применение цеолитов в животноводстве и ветеринарии перспективно в качестве профилактического и лечебного средства, диетической кормовой добавки, подстилки для животных и птицы и т.п. [7, 8, 9]. Природные цеолиты представляют собой минералы вулканического происхождения — цеолитсодержащие туфы. Они обладают уникальными сорбционными, ионообменными, молекулярно-ситовыми, каталитическими свойствами, обуславливающими их положительное влияние на физиологическое состояние организма человека, животных и птицы. Благодаря своим физико-химическим свойствам они стабилизируют кишечную физиологию, нормализуют внутреннюю среду, что приводит к улучшению конверсии кормов. Однако сами цеолиты не заменяют основные питательные вещества.

Сочетание применения указанных кормовых добавок позволяет эффективно их использовать, особенно для молодняка крупного рогатого скота, поросят и других сельскохозяйственных животных, для птиц и рыб.

Технологической задачей работы явилось создание высококалорийной биологически активной добавки в виде пасты, порошка или гранул для животных и птицы на основе кормовых дрожжей со сниженным содержанием нуклеиновых кислот и природного наполнителя.

Поставленная задача решается путем использования денуклеотизированных дрожжей как отходов производства лекарственных препаратов на основе нуклеиновых кислот.

Материалы и методы

В настоящее время в НИКТИ БАВ разработана технология получения лекарственных препаратов на осно-

ве нуклеиновых кислот путем ферментативного гидролиза дрожжей типа *Saccharomyces cerevisiae* [10, 11]. Отходы данного производства представляют собой частично гидролизованную биомассу дрожжей в виде пасты с извлеченными нуклеиновыми кислотами (денуклеотизированный дрожжевой продукт — ДНДП) [12]. Для исследования было приготовлено 5 партий ДНДП.

Физико-химические показатели пасты. Содержание массовой доли влаги в ДНДП определяли согласно методике [13]. Содержание сахара определяли по реакции с антроновым красителем [14]. Содержание золы определяли методом высокотемпературного озоления [15]. Белок анализировали по методу Лоури [16]. Содержание нуклеотидного материала определяли методом щелочного гидролиза [17]. Содержание сахаров, белка и РНК в образцах высчитывали от массы сухого препарата.

Дополнительный зоотехнический анализ ДНДП проводили общепринятыми методами [18]. Оценивали массовые доли сырого протеина, сырой золы, сырого жира и сырой клетчатки.

Аминокислотный состав ДНДП определяли на аминокислотном анализаторе ААА-881 (ЧССР).

Биологические показатели ДНДП. Микробиологические показатели (общую обсемененность и наличие условно патогенной микрофлоры) оценивали стандартными методами [19].

Лабораторные животные (мыши). Переносимость денуклеотизированного дрожжевого продукта лабораторными животными изучали на белых беспородных мышах. В опыт было отобрано 40 животных (по 20 особей в опытной и контрольной группах). Перед началом эксперимента, в процессе кормления и во время восстановления (без кормовой добавки) фиксировали массу животных. Прирост массы животных опытной группы рассчитывали по отношению к контрольной (в %). Показатели резистентности оценивали по фагоцитозу макрофагов [20] у белых беспородных мышей, получавших ДНДП в течение 5 дней в дозе 1 г/кг.

Сельскохозяйственные животные.

Поросята. Эксперимент по применению данного препарата на поросятах был проведен на свиноферме в учебно-опытном хозяйстве НГАУ «Тулинское» (Новосибирск). Для изучения эффективности применения ДНДП в кормлении поросят-сосунов породы СМ-1 был поставлен опыт, по принципу аналогов были сформированы 2 группы поросят (контрольная и опытная) по 50 голов в каждой. Контрольные животные с 7–10-дневного возраста получали хозяйственную подкормку

— основной рацион, который соответствовал всем нормам кормления, разработанным во Всероссийском институте животноводства (ВИЖ). Поросята опытной группы дополнительно к основному рациону с 7-дневного возраста получали ДНДП из расчета 0,3 г на 1 кг живой массы в сутки. Перед скармливанием добавка ДНДП, размороженная до однородной жидкой массы, перемешивалась с основным кормом. Добавка скармливалась поросятам до момента их отъема в 60-дневном возрасте.

При проведении эксперимента учитывались следующие показатели: живая масса поросят в начале и в конце опыта; живая масса поросят в 21-дневном возрасте; абсолютный прирост живой массы; среднесуточный прирост живой массы; валовый прирост живой массы; затраты корма на производство 1 кг прироста живой массы поросят.

С целью изучения иммуномодулирующих свойств ДНДП у поросят 2-месячного возраста осуществляли забор крови для сравнительной оценки иммунного статуса животных. При этом определяли гематологические показатели по общепринятым методикам [20]: содержание иммуноглобулинов (IgG) — методом простой радиальной иммунодиффузии по Манчини, общее количество Т-лимфоцитов — в реакции спонтанного розеткообразования лимфоцитов с эритроцитами барана (ТЕ-РОК), количество В-лимфоцитов — в реакции спонтанного розеткообразования лимфоцитов с эритроцитами мыши (ЕМ-РОК).

Птица. Предварительные опыты по применению ДНДП, проведенные на цыплятах, показали трудности введения пастообразной массы в рацион птицы. Попытки высушить биомассу ДНДП при температуре 100–150 °С приводили к большой спекаемости образцов и необходимости их дальнейшего размола. Это обстоятельство затрудняет технологию приготовления и удорожает конечный продукт.

Добавление к биомассе ДНДП природных цеолитов в соотношении 1 : (0,5–1,5) позволяет приготовить конечный продукт с хорошей рассыпаемостью и потому удобный для применения в птицеводстве, обозначенный как биостимулирующая кормовая добавка (БСКД). Кроме того, благодаря своим физико-химическим свойствам цеолиты стабилизируют кишечную физиологию, нормализуют внутреннюю среду, что приводит к улучшению конверсии кормов. Конечный продукт БСКД получают при температуре 70 ± 5 °С в виде порошка и гранул.

Опыты по оценке влияния на стимуляцию продуктивности и резистентности птицы при внесении в

основной рацион ДНДП, БСКД, бифидобактерина проведены на цыплятах-бройлерах.

С целью определения влияния на цыплят-бройлеров сформировали 4 группы, которым ежедневно в течение 52 дней скармливали основной рацион (контрольная группа), основной рацион + 3% от этого рациона ДНДП (1-я опытная группа), основной рацион + 3% от этого рациона БСКД (2-я опытная группа) и основной рацион + бифидобактерин (в соответствии с наставлением по применению) — группа сравнения. Численность каждой из групп составляла 108 голов.

Результаты и обсуждение

Физико-химические показатели денуклеотизированных дрожжей. Показатели, характеризующие состав ДНДП, представлены в таблице 1.

Физико-химический и биологический анализ 5 партий ДНДП показал, что полученный продукт содержит в среднем 2,78% белка, 18,88% сахаров, липополисахаридов — 9,8% и лишь 0,676% нуклеиновых кислот (РНК), что в 10–15 раз ниже, чем в исходной биомассе дрожжей.

Содержание компонентов ДНДП высчитывается от массы сухого препарата. ДНДП представляет собой пасту с водородным показателем рН 6,64, массовой долей влаги — 76,36% и золы — 9,42% (охарактеризованной после озоления пасты и имеющей в составе минеральные вещества).

Проведенный анализ полученных результатов показал, что оценка белков по методу Лоури не позволяет полностью определить их количество в ДНДП, так как часть этих протеинов находится в связанном состоянии; поэтому дополнительно использовали для оценки суммарных белков метод Кьельдаля.

Повторная работа по определению и расширению данных по химическому составу ДНДП показала, что в сухом веществе продукта содержится: протеина (определен по методу Кьельдаля) — от 20,41 до 25,5%; жира (определен методом экстракции в органическом растворителе) — от 6,8 до 8,1%; золы (определен методом сухого озоления) — от 47,9 до 55,2%; клетчатки — от 14,1 до 26,5% (метод Геннеберга и Штомана в модификации).

Был определен также аминокислотный состав ДНДП. Содержание аминокислот в 5 партиях ДНДП приведено в таблице 2. Из таблицы 2 видно, что в составе белков ДНДП содержатся довольно большие количества незаменимых аминокислот. Суммарное количество

Состав образцов денуклеотизированного дрожжевого продукта (ДНДП)

Показатель	Номер образца					Средняя
	1	2	3	4	5	
1. Внешний вид	Паста	Паста	Паста	Паста	Паста	Паста
2. Массовая доля влаги, %	74,5	79,1	74,9	75,0	78,3	76,36 ± 2,16
3. Водородный показатель, рН	6,6	6,7	6,7	6,6	6,6	6,64 ± 0,050
4. Содержание золы, %	9,9	9,3	11,1	11,3	5,5	9,42 ± 2,34
5. Содержание сахара, %	11,3	20,5	17,7	21,0	23,9	18,88 ± 4,77
6. Содержание белка, %	2,4	2,6	2,1	2,5	4,3	2,78 ± 0,87
7. Содержание РНК, %	1,03	0,77	0,74	0,28	0,56	0,676 ± 0,278
8. Содержание органики (D), %	15,6	11,6	14,0	13,7	16,2	14,76 ± 1,80

Таблица 2

Содержание аминокислот в ДНДП в %

Аминокислота	Номер партии				
	1	2	3	4	5
Лизин	1,75	1,876	2,452	2,045	1,729
Гистидин	0,362	0,426	0,463	0,379	0,341
Аргинин	1,027	1,384	1,545	1,236	1,195
Аспарагин	1,902	2,59	2,549	2,674	2,307
Треонин	1,198	1,412	1,473	1,358	1,093
Серин	1,607	1,202	1,621	1,194	1,009
Глутамин	3,033	3,281	3,674	3,394	3,245
Пролин	0,996	1,286	1,107	1,182	0,974
Глицин	0,886	1,022	1,076	0,947	0,899
Аланин	1,385	1,752	1,991	1,687	1,572
Валин	1,094	1,157	1,200	1,221	1,117
Метионин	0,296	0,335	0,295	0,287	0,279
Лейцин	1,611	1,718	2,144	1,775	1,574
Тирозин	0,786	0,813	0,858	0,901	0,793
Фенилаланин	0,900	0,939	1,101	1,11	0,996
Суммарная	19,72	22,27	24,86	22,53	20,11

аминокислот (в %) совпадает с содержанием белков в ДНДП, определенных по методу Кьельдаля. Следовательно, ДНДП может использоваться как ценная кормовая добавка, поскольку имеет значительные количества белков и липидов, которые являются основными поставщиками энергии.

Указанные выше 5 партий ДНДП были проверены по микробиологическим показателям. Показано, что условно патогенная микрофлора (сальмонеллы, золотистый стафилококк, кишечная палочка, клостридии) в образцах отсутствуют. Общая обсемененность ДНДП значительно ниже допустимой нормы (не более 500 тыс.

Таблица 3

Влияние ДНДП на массу (г) беспородных мышей при длительном скармливании

Группа	Масса животных (г) после скармливания на n день						
	Исход.	2-й день	4-й день	7-й день	10-й день	12-й день	Восст. 8 дней
Опытная (n=20)	18,3±0,3	20,6±0,4	21,1±0,3	24,2±0,3	24,9±0,3	27,4±0,3	28,9±0,6
Контрольная (n=20)	17,9±0,2	18,9±0,2	19,2±0,3	22,6±0,3	23,7±0,5	26,6±0,5	27,7±0,6
Отношение опыт/контроль, в %	102,2	109,0	109,0	107,1	105,1	103,0	104,3

Таблица 4

Активация фагоцитоза перитонеальных макрофагов мышей после 5-дневного скармливания ДНДП

Группа, препарат	Показатели фагоцитоза			
	ФА	% к К	ФИ	% к К
Контрольная (n=6), физиол. р-р	18,2±5,5	100	1,20±0,1	100
Опытная № 1 (n=6)	35,8±5,8	185,4	1,35±0,1	107,6
Опытная № 2 (n=6)	32,4±2,9	168,7	1,30±0,1	108,3

Таблица 5

Живая масса поросят в различные возрастные периоды, кг

Группа	Возраст, дней		
	Суточные	21	60
1 – контрольные	1±0,0114	6,22±0,236	19,026±0,430
2 – опытные	1±0,0110	6,76±0,256	20,596±0,412 ⁺⁺

микробных тел в 1 г) и остается в этих пределах ($3 \cdot 10^2$ микробных тел в 1 г) в течение 6 месяцев.

Биологические показатели ДНДП на лабораторных животных. Результаты изучения переносимости дenuклеотизированного дрожжевого продукта на лабораторных животных (белых беспородных мышях) приведены в таблице 3. Использование ДНДП в качестве кормовой добавки в ежедневном рационе беспородных мышей при длительном 12-дневном скармливании в количестве 1 г на голову показало ее хорошую переносимость и более быстрый рост массы тела опытных животных по сравнению с контрольными, получавшими обычный корм. Кроме того, отмечена высокая пищевая привлекательность ДНДП.

Влияние кормовой добавки на показатели резистентности оценивали по фагоцитозу перитонеальных макрофагов белых беспородных мышей, получавших ДНДП в течение 5 дней в дозе 1 г/кг (табл. 4).

Опыт показал, что введение в рацион мышей ДНДП стимулирует фагоцитарную активность (ФА) перитонеальных макрофагов на 69–85% в опытных группах по сравнению с показателями мышей контрольной группы, получавших физиологический раствор. Фагоцитарный индекс (ФИ) изменялся незначительно. Известно, что гликаны клеточных стенок дрожжей, согласно сообщениям Лазарева Д. Н., Алехиной Е. К. [21], обладают свойствами иммуномодуляторов. Корреляция высокого содержания сахаров в ДНДП (см. табл. 1) с

повышенной фагоцитарной активностью мышей, принимавших ДНДП, подтверждает это. В последнее время препаратам на основе клеточных стенок дрожжей (маннанные олигосахариды – МОС) придается большое значение. Маннанные олигосахариды являются многообещающей альтернативой антибиотикам. В настоящее время в США разработаны коммерческие препараты Био-МОС (Bio-Mos, Alltech, Inc), которые содержат маннанные олигосахариды. МОС – это сложные неперевариваемые углеводы, экстрагированные из клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Биологические показатели ДНДП на сельскохозяйственных животных (поросята). В результате проведенного эксперимента было установлено, что скормление поросытам денуклеотизированных дрожжей ДНДП способствовало увеличению прироста их живой массы (табл. 5). На основании данных таблицы 5 можно сделать вывод, что поросята, получавшие добавку, имели прирост живой массы в 21-дневном возрасте выше на 8,7% и в 60-дневном возрасте – на 8,25%, чем контрольные животные. При постановке на опыт живая масса

поросят контрольной и опытной групп была одинаковой. Показатели абсолютного прироста живой массы поросят свидетельствуют об увеличении скорости роста опытных поросят, по сравнению с контролем, в первый период – на 10,34%, во второй период – на 8,04%.

Введение денуклеотизированных дрожжей в рацион поросытам опытной группы способствовало увеличению их среднесуточного прироста, снижению затрат корма на прирост живой массы (табл. 6, 7). Из данных таблицы 6 следует, что, по сравнению с контрольной группой, среднесуточный прирост опытных поросят увеличился на 8,87%, что способствовало получению в конце опыта более высокого валового прироста в опытной группе, а это, в свою очередь, позволило уменьшить затраты корма на 1 килограмм прироста живой массы на 8,9% (см. табл. 7).

В результате гематологического и иммунологического скрининга установлено, что поросята опытной группы имеют статистически достоверное превосходство над контрольными животными по количеству лейкоцитов на 10% и по концентрации иммуноглобулина (IgG) – на 60%.

Таблица 6

Среднесуточный и валовый прирост живой массы поросят

Группа	Валовый прирост, кг	Среднесуточный прирост, г	% к контролю
1 – контрольная	901,3	300,0	100
2 – опытная	979,8	326,6	108,87

Таблица 7

Затраты корма на килограмм прироста живой массы поросят

Показатели	Группа	
	1 – контрольная	2 – опытная
Количество животных в группе	50	50
Потреблено корма, к. ед.	1650	1650
Валовый прирост, кг	901,3	979,8
Затраты корма на 1 кг прироста живой массы, к. ед.	1,83	1,68

Кроме того, опытная группа по сравнению с контрольной имеет несколько лучшие показатели ТЕ-РОК, ЕМ-РОК, моноцитов и гемоглобина. Разница соответственно составляет 9,8, 23, 50 и 7,5% (табл. 8).

Анализируя полученные данные, можно сделать заключение, что для повышения прироста живой мас-

сы поросят, снижения затрат кормов на производство продукции и усиления клеточного и гуморального иммунитета к отъему эффективно вводить в рационы поросят-сосунов с 7-дневного возраста до момента отъема в 60-дневном возрасте денуклеотизированные дрожжи (ДНДП) из расчета 0,3 г на голову в сутки. Это позволя-

Таблица 8

**Гематологические и иммунологические показатели
поросят-сосунов, получавших ДНДП**

Показатель	Группа	
	1 – контрольная	2 – опытная
Лейкоциты, тыс. мм ³	15,22±0,443	17,5±0,63
Эритроциты, млн. мм ³	5,6±0,226	5,8±0,348
Гемоглобин, г/л	96±3,52	103,2±6,94
Нейтрофилы, %		
- юные	0	0
- палочкоядерные	5±0,7	4,8±0,73
- сегментоядерные	29±1,37	24,6±1,91
Эозинофилы, %	1,8±0,73	1,8±0,37
Базофилы, %	0	0
Лимфоциты, %	63,4±2,38	65,6±2,20
Моноциты, %	0,8±0,2	1,2±0,2
ТЕ-РОК, %	55±2,55	60,4±1,16
ЕМ-РОК, %	7±0,7	8,6±0,8
Иммуноглобулин, IgG, мг/мл	9,22±0,24	14,74±0,93

Таблица 9

**Живая масса (г)/% и сохранность цыплят-бройлеров
при использовании в качестве кормовой добавки ДНДП, БСКД, бифидобактерина**

Группа	Живая масса, г/%			Сохранность, %
	Возраст, дни			
	7	21	52	
Контрольная, основной рацион (n=108)	91,4±0,8 100%	383±24,6 100%	1503±4,5 100%	80,5
1-я опытная, основной рацион + ДНДП (n=108)	92,0±0,8 100,7%	356±14,9 93,0%	1542±17 102,6%	82,4
2-я опытная, основной рацион + БСКД (n=108)	95,8±0,8 104,8%	415±13,7 108,4%	1602±7,4 106,6%	90,7
Бифидобактерин + основной рацион (n=108)	92,7±0,8 101,4%	383±22,6 100%	1480±22 98,5%	84,2

ет увеличить среднесуточный прирост поросят, снизить затраты корма на килограмм прироста живой массы и вывести на более высокие уровни ряд показателей иммунного статуса свиней, определяющих резистентность животных.

Положительное действие маннано-глюкановых олигосахаридов при выращивании поросят было получено также в опытах бельгийского исследователя N. Van der

Веке [22]. В проведенных опытах использовался контрольный корм, корм с включением МОС (2 кг/т) и корм с добавкой МОС и *Lactobacillus*. Экспериментальный корм использовался с 14-го дня после отъема поросят до достижения 16 кг массы тела. Маннано-глюкановые олигосахариды улучшили привесы поросят на 7,3% и эффективность использования корма – на 5,6%. Добавки кормовых микроорганизмов (*Lactobacillus*) вместе с МОС

еще больше улучшили продуктивность выращивания поросят. Положительное влияние указанных кормовых добавок, как считает автор данного исследования, могло быть связано со снижением смертности и диареи животных.

Биологические показатели ДНДП и БСКД на птицах. Использование БСКД в качестве кормовой добавки в ежедневном рационе цыплят-бройлеров в течение 52 дней в количестве 3% от основного рациона показало, что живая масса цыплят к концу опыта увеличилась на 6,6% по сравнению с контролем, а сохранность птицы возросла на 10,2% (табл. 9). Для сравнения: введение в рацион цыплят пастообразного ДНДП дало прирост живой массы лишь на 2,6%, а сохранности — на 1,9%; при использовании бифидобактерина эти показатели составили -1,5 и 3,7%, соответственно.

Современные тенденции в мире в области производства кормов для сельскохозяйственных животных и птиц направлены на ограничение и полный запрет использования кормовых антибиотиков. Причина этого лежит в предположении о том, что использование антибиотиков приводит к появлению лекарственно устойчивых форм бактерий, которые передадут эту устойчивость патогенам человека. Если это случится, то антибиотики, эффективные в настоящее время при лечении заболеваний, станут абсолютно бесполезными [22].

Ситуация, сложившаяся в отношении антибиотиков, подталкивает производителей кормовых добавок, животноводческой и птицеводческой продукции к поиску новых форм препаратов и альтернатив антибиотикам, удовлетворяющих современным требованиям сельскохозяйственного производства.

В качестве таких альтернатив могут рассматриваться МОС, пробиотики, биологически активные вещества и иммуномодуляторы на основе РНК, являющиеся продуктами микробиологического синтеза, повышающие иммунологическую реактивность организма [22, 23].

Маннанные олигосахариды повышают продуктивность и улучшают здоровье птицы, свиней и телят, главным образом, путем улучшения физиологического состояния кишечника и активации физиологических механизмов защиты. Совмещенные с сорбентами (препарат Микосорб — Bio-Mos, Alltech, Inc) они позволяют также эффективно ингибировать микотоксины.

Заключение

Таким образом, разработана новая высокоэффективная кормовая добавка на основе частично гидролизованных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, из которых

максимально извлечены нуклеиновые кислоты (ДНДП), что позволяет избежать последствий, связанных с нарушением нуклеинового обмена у животных. Кроме того, введение в ДНДП цеолита дает возможность получить продукт, биостимулирующую кормовую добавку (БСКД), удобную для применения в птицеводстве, благотворно влияющую на продуктивность и резистентность животных и птицы.

В НИКТИ БАВ ФГУП ГНЦ ВБ «Вектор» из отходов производства препаратов на основе рибонуклеиновых кислот разработаны кормовые добавки, содержащие МОС. Это — дрожжевой денуклеотизированный продукт (ДНДП) и биостимулирующая кормовая добавка (БСКД). По результатам испытаний ДНДП и БСКД по эффективности не уступают препарату Био-МОС (Bio-MOS, Alltech, Inc), который содержит маннанные олигосахариды.

Биостимулирующая кормовая добавка является составляющим элементом в разработке безотходной технологии получения медицинских и ветеринарных препаратов на основе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. С использованием экологически безвредной биостимулирующей добавки может быть разработан также целый ряд специализированных кормовых добавок.

Литература

1. Белов Б.М., Величко Б.А., Данилов В.Н. Пути утилизации отходов, создание малоотходных и безотходных технологий ферментных препаратов / ВНИИСЭНТИ: Обзорная информация. — М., 1986. — 52 с.
2. Ксенофонтов Г.С., Селифонтова В.С. Способы обработки отходов микробиологических производств и их технико-экономическое обоснование / ВНИИСЭНТИ: Обзорная информация. — М., 1989. — 24 с.
3. Петрухин Н.В. Корма и кормовые добавки. Гл. 6. Корма микробиологического синтеза. Справочник. — М.: Росагропромиздат, 1989. — С. 177–198.
4. Таланов Г.А., Хмелевский Б.Н. Санитария кормов: Справочник. — М.: Агропромиздат, 1991. — С. 200–204.
5. ГОСТ 20083-74 Дрожжи кормовые. Технические условия. ИУС 2-93.
6. Покровский А.А. Перспективы использования белков одноклеточных организмов / В кн. Медико-биологические исследования углеводородных дрожжей (1964–1970 гг.). — М.: Наука, 1972. — С. 9–58.
7. Наставление по применению цеолитов. Утверждено ГУВ МСХ РФ. Рег. № 10.07.19.-ОВФП от 04.08.1992 г.
8. Шадрин А.М. Природные цеолиты Сибири в животноводстве, ветеринарии и охране окружающей среды. — Новосибирск, 1998. — 116 с.

9. Методические рекомендации по изучению природных цеолитов в кормлении сельскохозяйственной птицы / Разраб. сотр.: ВНИТИП – В.Н. Агеевым и др.; ИЭВСиДВ СО ВАСХНИЛ – А.М. Шадриним; СибНИПТИЖ СО ВАСХНИЛ - К.Я.Мотовиловым; УНИИП – С.А. Водолажченко; ВГНКИ – Б.А. Тимофеевым, Р.Г. Босташвили. Одобрены, утверждены и рекомендованы к печати Секцией птицеводства отделения животноводства ВАСХНИЛ 20 июня 1985 г., протокол № 2/СО ВАСХНИЛ. Новосибирск, 1985. – С. 15.
10. Авторское свидетельство СССР № 1602018, кл. С07Н21/02, 1990 г., БИ № 34.
11. Патент РФ № 2083221, кл. А61К38/20, 1997 г., БИ № 19.
12. Патент РФ № 2189762 от 27.09.2002 г. «Биостимулирующая кормовая добавка».
13. ГФ Х1. вып. 1. – С. 176.
14. ФС 42-3874-99. – С. 15.
15. ГФ. Х1. вып. 2. – С. 25.
16. Lowry O.H. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 197. – P. 265–275.
17. Галкин В.В., Бердышев Г.Д. // Биохимия. – 1968. – Т. 33. – № 1. – С. 66–75.
18. Зоотехнический анализ кормов / Е.А. Петухова, Р.Ф. Бессарабова, Л.Д. Халеньева, О.А. Антонова – М.: Колос, 1981. – 276 с.
19. Правила бактериологического исследования кормов. ГУВ МСХ СССР. – М.: Колос, 1976. – С. 18.
20. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. – М.: Медицина, 1987. – С. 82–88.
21. Лазарева Д.Н., Алехин Е.Л. Стимуляторы иммунитета. – М.: Медицина, 1985. – 256 с.
22. Van der Beke N. // *Feeding times*. – 2001. – Vol. 4. – N 1. – P. 3–39.
23. Аликин Ю.С. Стимуляторы неспецифической резистентности на основе РНК для ветеринарной медицины. Автореф. дис. на соиск. уч. степени докт. биол. наук, Новосибирск, 1998. – 44 с.

Список сокращений

БАВ – биологически активные вещества,
 БВК – белково-витаминный концентрат,
 ДНДП – денуклеотизированный дрожжевой продукт,
 БСКД – биостимулирующая кормовая добавка,
 МОС – маннанные олигосахариды

THE STUDY OF THE POSSIBILITY OF USING NUCLEIC ACID PRODUCTION WASTES FOOD (DENUCLEOTIZED YEASTS) AS FEED ADDITIVES

Yu. S. ALIKIN¹, V.P. KLIMENKO¹, V.I. MASYSHEVA¹, T. A. TERESHCHENKO¹, V.A. FADINA¹,
 I.A. LENIVKINA², D.V. KROPACHEV², K.Ya. MOTOVILOV², N.S. KHRUSTALEVA²

¹ Institute of Medical Biotechnology State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Berdsk, Novosibirsk Region; ² Novosibirsk State Agricultural University, Novosibirsk

By authors are developed denucleotized yeast fodder additives from production wastes of medical products on the basis of the nucleic acids, containing mannan oligosaccharides. The structure of the pastelike form of the additive – denucleotized a yeast product (DYP) is certain. Its toxicity is investigated (at feeding to white not purebred mice in a doze 1 g/head within 10 days). DYP was nontoxic and stimulated phagocytosis of peritoneal macrophages. For studying efficiency of application DYP in feeding sucking-pigs breeds CM1 experience on 50 heads received the additive daily in addition to the basic diet in a doze of 0,3 g/kg is put. Feeding to pigs DYP within 60 days promoted an increase in the gain of their alive weight. The pigs received the additive, had the greater alive weight in 21 day age on 8,7% and in 60 day age – on 8,25%, than control animals. Addition of natural zeolites allows to prepare for an end-product with good dispersibility and consequently convenient for application in the poultry farming, designated as the biostimulating fodder additive (BFA). Use of BFA as a fodder additive in the daily diet of broilers within 52 days in quantity from the basic diet of 3% has shown, that the alive weight of chickens by the end of experience has increased for 6,6% in comparison with the control, and safety of a bird has increased on 10,2%.

Keywords: fodder additives, denucleotized yeast, mannan oligosaccharides, animal industries, poultry farming.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ дсРНК

Ю.С. АЛИКИН^{1*}, В.И. МАСЫЧЕВА¹, Г.М. ЛЕВАГИНА¹, Е.Д. ДАНИЛЕНКО¹,
В.А. ФАДИНА¹, Е.Ю. РОСЛЯКОВА¹, Г.М. ИГНАТЬЕВ¹, С.И. ПРУДНИКОВ²,
Т.М. ПРУДНИКОВА², А.А. ДУХОВСКИЙ²

¹ *Институт медицинской биотехнологии ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», Бердск-10, Новосибирская область,*

² *ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН, п. Краснообск
Новосибирской области*

Препараты на основе дсРНК Вестин и Комплекс А обладают выраженными специфическими биологическими свойствами (индукция эндогенных интерферонов, активация фагоцитоза макрофагов, широкий спектр противовирусных эффектов), обеспечивающими лечебно-профилактическое действие этих препаратов при сочетанных инфекционных болезнях поросят, повышая их резистентность к ним и уменьшая падеж.

Ключевые слова: индукторы интерферона, двуспиральная РНК (дсРНК), вирусные инфекции, фагоцитоз макрофагов, смешанные инфекционные болезни поросят.

В современном животноводстве России, как и во всем мире, остро стоит проблема профилактики и борьбы с массовыми опасными и особо опасными вирусными и бактериальными болезнями животных (особенно молодняка), обусловленными вторичными иммунодефицитами различного происхождения, широким распространением латентного вирусного носительства, технологическими и техногенными факторами, нарушением обменных процессов, ослабляющих иммунный статус организма. Эти факторы очень часто приводят к развитию ассоциативных (сочетанных вирусных и бактериальных) инфекций. Наиболее распространенными заболеваниями являются хламидиоз и вирусные инфекции крупного рогатого скота; в свиноводстве — корона- и ротавирусные инфекции, а также чума свиней. Серьезную проблему представляет антропозооноз — лептоспироз, передающийся от животных человеку. Точно такая же постановка вопроса обусловлена угрозой биотерроризма, особенно в отношении антропозоонозов и очаговых инфекций. Все это требует

применения комплексных препаратов, обладающих этиотропным противовирусным и антибактериальным действием, с обязательной коррекцией иммунного ответа у таких организмов.

В НИКТИ БАВ ГНЦ ВБ «Вектор» длительное время, начиная с середины 70-х гг. занимаются исследованием и созданием индукторов интерферона на основе дсРНК синтетического (полирибонуклеотидов) и природного (дрожжевых и фаговых) происхождения. В результате созданы высокоэффективные противовирусные препараты (медицинский — ридостин и ветеринарный — вестин) против широкого круга вирусов человека и животных. В настоящее время разрабатываются различные формы этих препаратов: мазевые и пролонгированные [1, 2, 3].

Одним из таких новых препаратов является комплексный препарат (Комплекс А) на основе двуспиральных и однонитевых рибонуклеиновых кислот с добавлением поливинилпирролидона. По составу это — комплекс натриевых солей одно- и двуспиральных РНК киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и синтетического полимера-носителя.

Внедрение разработанных препаратов индукторов интерферона на основе дсРНК и способов применения в ветеринарную практику позволит использовать их в качестве этиотропных средств экстренной профилактики и лечения вирусных заболеваний у различных живот-

* **Автор для переписки:**

© 2006 г. Аликин Юрий Серафимович,
начальник отдела, Институт 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: alikiny@mail.ru

ных. Способность этих препаратов легко сочетаться с антибактериальными средствами, усиливая их действие и корректируя их иммунодепрессантные свойства, представляет уникальную возможность для создания комплексных противoinфекционных биотиков широкого спектра действия.

Целью работы явилось сравнительное изучение противoinфекционных свойств вестина и Комплекса А на лабораторных и производственных продуктивных животных.

Материалы и методы

Препараты. Для исследований использовали препарат Вестин, ветеринарный аналог медицинского препарата Ридостин (ООО «Диафарм», г. Бердск Новосибирской области), в качестве препарата сравнения [2, 3]; комплекс А, пролонгированный индуктор интерферона на основе дсРНК из дрожжей [1]. Все указанные препараты были охарактеризованы по физико-химическим и биологическим свойствам.

Животные. Опыты по изучению биологических свойств вестина и Комплекса А (фагоцитоз макрофагов, индукцию интерферона) проводили на беспородных мышцах ICR, а противовирусных — на мышцах линии СВА.

Производственные опыты проводили на поросятах породы крупная белая, принадлежащих двум крупным промышленным комплексам в Западно-Сибирском регионе, неблагополучным по инфекционным болезням свиней.

Методы. Для характеристики потенциальных противoinфекционных свойств препаратов на основе дсРНК использовали оценку фагоцитоза перитонеальных макрофагов мышей, индукцию интерферона у мышей после в/м введения препарата и противовирусные свойства на модели заражения мышей вирусом Ласса, вызывающим аренавирусную геморрагическую лихорадку [3, 4, 5, 6].

Сравнительные профилактические и лечебные эффекты вестина и Комплекса А изучали в производственных опытах на поросятах от 10- до 90-дневного возраста. Состояние животных опытных и контрольных групп, подобранных по принципу аналогов, оценивали по клиническим признакам и результатам лабораторных анализов.

Результаты исследований и обсуждение

Резистентность организма контролируется иммунной системой, уровнем его метаболических реакций,

осуществляющих адаптацию к условиям среды, а также его способность противостоять инфекциям.

Уровень резистентности организма лабораторных животных под действием вестина и Комплекса А. Индукция интерферона. Индуктор интерферона вестин на основе природной двуспиральной РНК киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* обладает выраженной интерферониндуцирующей активностью в организме мышей и кроликов (табл. 1), сравнимой с аналогичными свойствами синтетических (поли И : поли Ц (Поли I : C) и поли Г : поли Ц) и других природных интерфероногенов (фага f2). Максимальный специфический эффект развивается при введении доз дсРНК 2,5–10 мг/кг.

Таблица 1

Сравнительная интерферониндуцирующая активность различных препаратов РНК

Наименование препарата	Количество препарата, мг/кг	Титр интерферона, ИЕ50/0,2 мл
Натрия хлорид изотонический 0,9%		<10
Вестин (содержание дсРНК 22%)	2,5	1888±36,95*
Высокополимерная (вп)РНК	2,5	38±2,3*
Поли I : C	2,5	210±34,6

* различия с контролем достоверны, $p < 0,05$

Сравнительное изучение интерферониндуцирующей активности различных РНК показало, что вестин (содержание дсРНК 22%) в дозе 2,5 мг/кг обладал высокой способностью к индукции интерферона в сравнении с синтетическим двуспиральным комплексом Поли I : C в той же дозе. Препарат однонитевой высокополимерной РНК (впРНК) в сравнении с физиологическим раствором вызывал незначительную индукцию интерферона, однако в сравнении с комплексом Поли I : C и субстанцией дрожжевой дсРНК данный препарат в дозе 2,5 мг/кг практически неактивен.

В таблице 2 представлены результаты, характеризующие интерферониндуцирующую активность 5 разных партий препарата Вестин на основе дрожжевой дсРНК в зависимости от дозы при в/б введении белым беспородным мышам. Максимальные титры интерферона

(853–1173 ИЕ/0,1 мл) в сыворотке крови наблюдаются при введении вестина в дозах 5–10 мг/кг. Но и в дозе 2,5 мг/кг вестин способен вызывать значительную продукцию интерферона.

Таблица 2

Интерферониндуцирующая активность вестина при в/б введении беспородным мышам

№ партии препарата	Титры интерферона (ИЕ50 /0,1 мл) в сыворотке при введении ридостина (вестина) в дозах (мг/кг)			
	0,07	2,5	5	10
1	30±3	586±39	1109±73	1173±173
2	<20	512±78	960±143	960±143
3	<20	480±72	853±135	853±135
4	<20	576±64	1024±156	960±156
5	<20	384±57	853±135	960±156

Индукция интерферона происходит при различных путях введения препарата в организм. Как видно на рисунке 1, индуктор интерферона на основе дсРНК киллерных дрожжей относится к индукторам «раннего» типа, то есть продукция интерферона (или интерферонов) происходит сразу же после введения. Максимум продукции зависит от способа введения: при в/в – через 0,5–2 часа, при в/б и в/м – через 4–6. К 24 часам сывороточный интерферон практически исчезает в организме мышей.

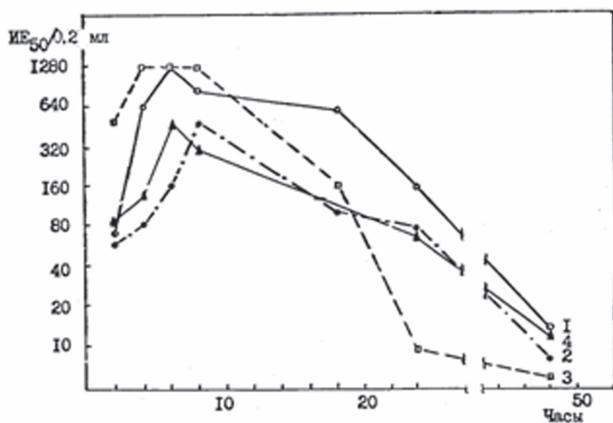


Рис. 1. Динамика накопления интерферона в сыворотке крови мышей при разных путях введения дсРНК:

- 1 – внутрибрюшинное;
- 2 – подкожное;
- 3 – внутривенное;
- 4 – внутримышечное

Подобная динамика интерфероногенеза наблюдается и у кроликов (рис. 2). Однако дозы индуктора интерферона, вызывающие такой ответ, в 2,5 раза ниже, чем для мышей – кролик относится к высокореагирующим животным.

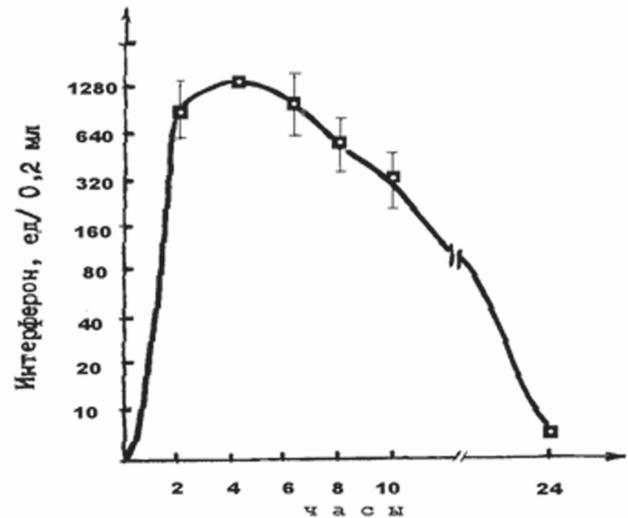


Рис. 2. Динамика накопления интерферона в сыворотке крови кроликов после внутривенного введения вестина в дозе 1 мг/кг

Другая динамика ответа на введение вестина наблюдается у поросят (рис. 3). Синтез интерферонов у поросят имеет 2 пика: через 6 и 12 часов. Максимальный ответ после первого введения индуктора интерферона в дозе 0,5 мг/кг развивается к 12 часам. Интерферон регистрируется в крови поросят в течение 3 суток.

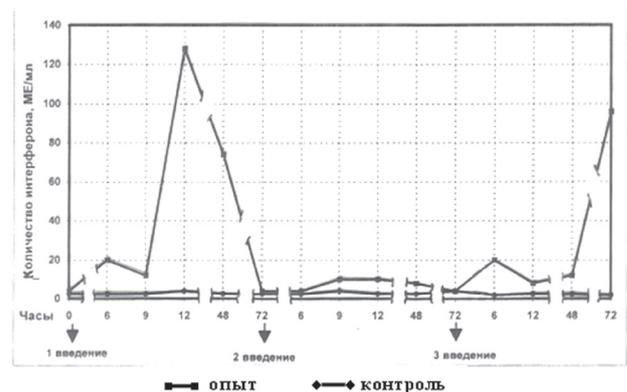


Рис. 3. Содержание эндогенного интерферона в сыворотке крови поросят после трехкратного введения вестина

После второго введения на протяжении 3 суток следует фаза рефрактерности или гипореактивности, «молчания» генов, ответственных за синтез интерфе-

рона. Последующее введение вестина пороссятам в той же дозе индуцирует синтез интерферона с характерным 2-пиковым профилем. У контрольных животных синтеза интерферона после введения физиологического раствора не наблюдается.

Сравнительные данные по индукции интерферона у мышей и пороссят под действием вестина и Комплекса А представлены в таблице 3.

Таблица 3
Индукция интерферона под действием различных препаратов дрожжевой дсРНК у мышей и пороссят

Вид организма	Индуктор интерферона	Содержание дсРНК, %	Максимум активности (в час)	Величина активности в ИЕ/мл
Мыши	Вестин	9	4–6	1109±73
Поросята	Вестин	9	12–48	128±16
Мыши	Комплекс А	2,4	24–48	148±30

Как показали исследования, уровень максимальной интерферониндуцирующей активности от введения вестина у мышей наблюдается через 4–6 ч, у пороссят – через 12–48 ч. При этом титры сывороточного интерферона на пике активности у мышей были в 8,7 раза выше, чем у пороссят. Динамика синтеза интерферонов и снижения их титров у мышей показывает, что к концу первых суток наблюдаются только остаточные количества интерферона в сыворотке животных. Динамика индукции интерферонов у пороссят под действием вестина носит более продолжительный характер. В то же время Комплекс А вызывает повышенный, по сравнению с фоновым, уровень титров интерферона, который сохраняется в течение 5 суток. Максимальные уровни наблюдались через 24–48 ч после в/м инъекции препарата. Необходимо отметить, что в препарате Комплекс А содержание дсРНК в 3,75 раза ниже, чем в препарате Вестин.

Активация фагоцитоза. Во всех исследованиях на моделях бактериальных и вирусных заболеваний сельскохозяйственных животных отмечали очень высокую фагоцитозстимулирующую реакцию на введение препаратов на основе вп- и дсРНК. Но в случае с дсРНК эта реакция носила преимущественно макрофагстимулирующий характер.

Нами были получены данные (табл. 4) по стимуляции фагоцитоза перитонеальных макрофагов мышей

Таблица 4

Изменение показателей фагоцитарной активности (ФА) перитонеальных макрофагов белых беспородных мышей в различные сроки после введения препаратов Комплекса А и вестина (5,0 мг/кг, п/к)

Препарат в дозе 5 мг/кг	Фагоцитарная активность (ФА)	
	ФА	% к контролю
24 ч после инъекции		
Вестин	50,0±0,7*	236
Комплекс А	37,9±3,2*	177
Контроль (физиологический р-р)	21,4±3,9	100
5 дней после инъекции		
Вестин	25,2±0,5	91
Комплекс А	47,5±0,9*	171
Контроль (физиологический р-р)	27,8±3,2	100
7 дней после инъекции		
Комплекс А	29,5±2,5	104
Контроль (физиологический р-р)	28,2±1,9	100

* различия с контролем (физиологический раствор) достоверны, $p < 0,05$

под действием дсРНК в дозе 5 мг/кг. В качестве объекта фагоцитоза использовали эритроциты барана. Вестин значительно стимулирует фагоцитарную активность (ФА) через 5 часов после инъекции и незначительно фагоцитарный индекс (ФИ). Эти данные чрезвычайно важны для понимания механизма противовирусного и иммуномодулирующего действия препаратов РНК. Известны экспериментальные данные о том, что эффекты стимуляции макрофагов связаны с синтезом γ -интерферона в организме [2, 3, 4]. Именно γ -интерферон индуцирует активность макрофагов, которые в дальнейшем синтезируют ряд цитокинов и лимфокинов, то есть активизирует цитокиновую «сеть» организма.

Как показывают приведенные в таблице 4 данные, Комплекс А обладает способностью повышать фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов мышей, причем, этот эффект был более длительным по времени до (5 суток), чем эффект препарата сравнения Вестин.

Противовирусные эффекты. Исследования противовирусных свойств дрожжевой дсРНК показали [3],

что препараты на ее основе обладают широким спектром противовирусных эффектов на различных семействах вирусов, определенных *in vivo* как у лабораторных, так и у сельскохозяйственных животных. Это — энцефалиты лошадей, обусловленные альфавирусами — до 50–75% защиты, флавивирусы — клещевой энцефалит (до 60% защиты), ортомиксовирусы — грипп (в том числе птиц) — до 83%, герпес вирусы — генитальный человека — до 70%, парамиксовирусы — в том числе чума собак (до 70–95%), парвовирусы — парвовирусный энтерит собак (до 75–80%), рабдовирусы — бешенство (до 30%), весенняя виремия карпа (до 78–100%) и др. Кроме этого эффекта, препараты дсРНК дрожжей обладают иммуноадьювантными свойствами, повышая эффективность вакцин против туберкулеза животных, мыта лошадей, классической чумы свиней [2, 3].

Сравнительные противовирусные эффекты вестина и Комплекса А были изучены на модели аренавирусной инфекции у мышей — геморрагической лихорадки Ласса. Результаты исследований представлены в таблице 5.

Таблица 5
Противовирусные эффекты различных форм дсРНК при экспериментальном заражении мышей вирусом Ласса

Препарат, условия введения	Выжившие / всего	% защиты	СПЖ (сутки)
Контроль (интактные)	0/20	0	7,69
Комплекс А, и/н, -24 ч, 5 мг/кг	5/20	25	8,92
Комплекс А, и/н, -4 ч, 5 мг/кг	9/20	45	8,62
Контроль ПВП, и/н, -24 ч, 5 мг/кг	0/20	0	8,25
Контроль ПВП, и/н, -4 ч, 5 мг/кг	1/20	5	8,42
Вестин, и/н, -24 ч, 5 мг/кг	3/20	15	8,62
Вестин, и/н, -4 ч, 5 мг/кг	8/20	40	9,22

Как показали результаты опыта, интраназальное введение Комплекса А за 4 часа до внутримозгового заражения мышей вирусом Ласса в дозе 1000 БОЕ/мышь обеспечивало 45% противовирусную защиту. У интактных животных (без введения препаратов) заражение

в такой же дозе приводило к 100%-ному летальному исходу. Вестин обеспечивал 40% степень защиты. Одновременно увеличивалась и средняя продолжительность жизни (СПЖ) у мышей в опытных группах. Необходимо при этом снова отметить, что в препарате Комплекс А содержание дсРНК в 3,75 раза ниже, чем в препарате Вестин.

Таким образом, препараты Комплекс А и Вестин обеспечивали защиту мышей при аренавирусной геморрагической лихорадке Ласса. Необходимо отметить, что в препарате Комплекс А содержание дсРНК в 3,75 раза ниже, чем в препарате Вестин.

Изучение профилактической эффективности препаратов индукторов интерферона на основе дсРНК против смешанных инфекционных болезней поросят в производственных условиях. На первом промышленном свинокомплексе в 2000 году падеж животных всех половозрастных групп составил 51951 голов, или 13,7% к обороту стада. Из них 49174 головы (95%) — поросята-сосуны и отъемыши. За 2000 год на этом комплексе на основании результатов патологоанатомического вскрытия и бактериологических исследований диагностировали следующие факторные инфекционные болезни: сальмонеллез — 1550 голов (3% к общему числу павших животных), гемофильная плевропневмония и полисерозит — 3756 голов (7,2%), дизентерия — 1010 голов (1,9%), колибактериоз — 175 (0,3%). По результатам наличия специфических антител (табл. 6) в сыворотке крови свиней к возбудителям инфекционных заболеваний у больных или павших животных в условиях данного производства диагностировали следующие факторные болезни в 1999–2001 гг.: пастереллез — 100%, сальмонеллез — 70,6%, респираторно-репродуктивный синдром свиней — синее ухо (РРСС) — 17,6%; ротавирусная болезнь свиней (РВБС) — 65,2%; парвовирусная инфекция свиней (ПВИС) — 82,4%; трансмиссивный гастроэнтерит свиней (ТГЭС) — от 52,9 до 63,0%; классическая чума свиней (КЧС) — от 32,3 до 50%.

Проведенные производственные опыты по применению индукторов интерферона на основе дсРНК показали следующие результаты.

Опыт 1. Новая лекарственная форма препарата на основе дсРНК (Комплекс А) в течение 2000–2001 гг. испытывалась в целях профилактики при сочетанных инфекционных болезнях на 115 поросятах 21-дневного возраста, живой массой 5,0 кг каждый. Проведена оценка состояния сохранности стада свиней и диагностика инфекционных заболеваний.

Таблица 6
Наличие специфических антител в сыворотке крови свиней к возбудителям инфекционных заболеваний в условиях промышленного комплекса

Заболевание	Год	Кол-во исследованных проб	Кол-во положительных проб/%	Кол-во отрицательных проб
Пастереллез	1999	17	17/100	—
Сальмонеллез	1999	17	12/70,6	5
Респираторно-репродуктивный синдром свиней — синее ухо (РРСС)	1999	17	3/17,6	14
Ротавирусная болезнь свиней (РВБС)	2000	46	30/65,2	16
Парвовирусная инфекция свиней (ПВИС)	1998	10	8/80,0	2
	1999	17	14/82,35	3
Трансмиссивный гастроэнтерит свиней (ТГЭС)	1999	17	9/52,9	8
	2000	46	29/63,0	17
Классическая чума свиней (КЧС)	2000	24	12/50,0	12
	2001	65	21/44,0	44

Поросят разделили по принципу аналогов на 3 группы по 37–40 голов в каждой. После введения препаратов состояние поросят было удовлетворительное, они хорошо поедали корм, были активны. За поросятами в течение 40 дней вели клинические наблюдения.

Результаты этого эксперимента представлены в таблице 7, из которой видно, что в первой группе (контрольной), с традиционным лечением, из 40 поросят за время наблюдения пало и вынужденно убито 8. Сохранность составила 80%, а среднесуточный прирост массы тела — $189 \pm 17,1$ г.

Во второй группе, после введения Комплекса А, пало и вынужденно убито 4 поросенка; сохранность составила 89,2%, а среднесуточный прирост $217 \pm 18,3$ г.

В третьей группе, после двукратного введения вестина в дозе 0,5 мг/кг, в течение 40 дней пало и вынуж-

денно убито 4 поросенка; сохранность составила 89,5%, среднесуточный прирост массы $198 \pm 9,4$ г.

Таким образом, в проведенных экспериментах было показано, что изучаемые препараты индукторов интерферона обладают положительным защитным действием на организм поросят 21-дневного возраста, что выражается как в снижении падежа, так и увеличении среднесуточных привесов.

Опыт 2. Во втором опыте проводили исследование влияния Комплекса А на 15-дневных поросят. 342 поросётам 15-дневного возраста вводили внутримышечно Комплекс А в дозе 0,3 мг/кг однократно. Контролем служили 338 поросят аналогичного возраста (им никаких препаратов не вводили). В результате через 30 дней в первой (опытной) группе уровень сохранности животных составил 80,7%, а во второй (контрольной) — 74,6%. Среднесуточный привес составил в первой группе — 190 ± 10 г., во второй — 170 ± 9 г.

Опыт 3. В третьем опыте 682 поросётам 45-дневного возраста (в день их передачи на участок доращивания) вводили внутримышечно Комплекс А в дозе 0,3 мг/кг массы животного однократно. Контролем служили 670 поросят аналогичного возраста (им никаких препаратов не вводили). В результате через 24 дня в первой (опытной) группе уровень сохранности животных составил 90,5%, а во второй (контрольной) — 69,5%. Среднесуточный привес составил в первой группе — 210 ± 11 г., во второй — 160 ± 8 г.

Опыт 4. В аналогичном опыте по изучению профилактической эффективности Комплекса А при смешанных инфекционных заболеваниях поросят в производственных условиях другого свиного комплекса использовали 329 поросят. Свинокомплекс в течение ряда лет стационарно неблагополучен по дизентерии, полисерозиту, колиэнтеротоксемии, трансмиссивному гастроэнтериту, колибактериозу, сальмонеллезу, микоплазмозу.

Поросятам опытной группы в возрасте 38 дней был введен Комплекс А (200 голов) по 0,3 мг/кг массы тела. В контрольной группе аналогичного возраста из 129 поросят никаких препаратов не вводили.

За всеми поросётами в течение 70 дней (до перевода на откорм) вели клинические наблюдения. Из 200 поросят первой (опытной) группы за 8 дней после первого введения Комплекса А заболел с признаками гастроэнтерита 21 поросенок (10,5%), из которых пало 5. Сохранность при передаче на участок доращивания составила 97,5%. В контрольной группе сохранность — 92,2%.

**Эффективность применения различных форм индукторов интерферона для профилактики
сочетанных инфекционных болезней поросят**

Группа	До начала опыта		Через 40 дней					
	Кол-во голов	Средний вес головы, кг	Кол-во голов	Средний вес головы, кг	Пало и в/убито, гол.	Пало и в/убито, %	Средне-суточный привес, г	Сохранность, %
1	40	4,7	32	12,2	8	20	189±17,1	80
2	37	5,4	33	14	4	10,8	217±18,3*	89,2*
3	38	5	33	12,9	4	10,5	198±9,4	89,5*

Примечание: * $P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой. Группа 1 – контроль; группа 2 – Комплекс А; группа 3 – Вестин

При передаче на доращивание часть слабых поросят из всех групп были переведены в сектор Пиг-Балья (сектор доращивания слабых и больных животных), из первой группы 61 гол. (31,3%) с массой тела 4,4 кг и из контрольной – 56 гол. (44,5%) с массой тела 4,3 кг.

При передаче на доращивание поросятам опытных групп был повторно введен иммуностимулятор в тех же дозах. За 70 дней на участке доращивания из первой опытной группы пал 1 поросенок, сохранность составила 99,2%, среднесуточный привес массы тела – 388 г. В контрольной группе за период доращивания из 66 поросят погибло 12 голов, сохранность составила 81,8% при среднесуточном приросте массы тела 308 г.

Как показали результаты наблюдений, к концу опыта в группе поросят после двукратного введения Комплекса А сохранность поросят была на 20,6%, а среднесуточный прирост массы тела – на 13,7% выше, чем в контрольной.

Заключение

Таким образом, препараты на основе дсРНК Вестин и Комплекс А обладают выраженными специфическими биологическими свойствами (индукция эндогенных интерферонов, активация фагоцитоза макрофагов, широкий спектр противовирусных эффектов), обеспечивающими лечебно-профилактическое действие этих препаратов при сочетанных инфекционных болезнях поросят, повышая их резистентность к ним и уменьшая падеж. В то же время препарат Комплекс А, обладающий пролонгированными свойствами по индукции интерферона и фагоцитарной активности макрофагов,

более предпочтителен для производственной практики. После его введения поросята лучше растут и развиваются, давая достоверно более высокий среднесуточный прирост массы тела. Характерно, что положительное действие препаратов отмечается при их применении в критические для поросенка сроки (отъем, передача на участок доращивания).

Литература

1. Патент № 2172631, опубл. в БИ № 24, 2001. «Индуктор интерферона пролонгированного действия»
2. Индукторы интерферона и перспективы их применения в медицине и ветеринарии: Обзор лит./ВАСХНИЛ. Сиб. отд-ние. ИЭВСиДВ. НПО «Вектор». НИКТИ БАВ.-Новосибирск, 1990. – 40 с.
3. Аликин Ю.С. Стимуляторы неспецифической резистентности на основе РНК для ветеринарной медицины. Автореф. дисс. на соиск. уч. степени докт. биол. наук. Новосибирск, 1998. – 44 с.
4. Ершов Ф.И., Парфенов В.В. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М., 2000. – 82 с.
5. Rook G.A.W., Steel J., Umar S., Dockrell H.M. // J. Immunol. Meth. – 1985. – Vol. 82. – N 1. – P. 161–167.
6. Симбирцев А.С., Пигарева Н.В., Конусова В.Г. и др. // Вестник РАМН. – 1993. – № 2. – С. 18–22.

Список сокращений

Поли И поли Ц или (Поли I : C) – синтетический комплекс полиинозиновой и полицитидиловой кислот,

Поли Г поли Ц — синтетический комплекс полигуаниловой и полицитидиловой кислот,
 дсРНК — двуспиральная рибонуклеиновая кислота,
 ИЕ — интерфероновые единицы,
 ФА — фагоцитарная активность, количество активированных фагоцитов (макрофагов), поглотивших объект фагоцитоза (эритроциты барана),
 ФИ — фагоцитарный индекс, количество фагоцитируемых частиц (эритроциты барана), поглощенных одним фагоцитом (макрофагом),
 в/в — внутривенное введение,

в/б — внутрибрюшинное введение,
 в/м — внутримышечное введение,
 и/н — интраназальное введение,
 б/п мыши — беспородные мыши,
 γ -интерферон — гамма интерферон (иммунный),
 БОЕ — бляшкообразующие единицы,
 СПЖ мышей — средняя продолжительность жизни мышей,
 ПВП — поливинилпирролидон, синтетический плазмозаменяющий препарат.

THE COMPARATIVE STUDY OF SPECIFIC PROPERTIES OF THE PREPARATIONS BASED ON dsRNA

Yu.S. ALIKIN¹, V.I. MASYCHEVA¹, G.M. LEVAGINA¹, E.D. DANILENKO¹, V.A. FADINA¹,
 E.Yu. ROSLYAKOVA¹, G.M. IGNATYEV¹, S.I. PRUDNIKOV², T.M. PRUDNIKOVA²,
 A.A. DUKHOVSKY²

¹ *Institute of Medical Biotechnology State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector»,
 Berdsk, Novosibirsk Region;*

² *Experimental Veterinary Institute of Siberia and Far East SD RAAS,
 Krasnoobsk, Novosibirsk Region*

The preparations based on dsRNA such as Vestine and Complex A exhibit pronounced specific biological properties (induction of endogenous IFNs, activation of macrophage phagocytosis, a wide spectrum of antiviral effects). These properties ensure treatment- and prophylactic effects of these preparations in the case of infectious diseases in pigs by enhancing their resistance and decreasing their death-rate.

Keywords: interferon inducers, dsRNA, viral infections, macrophage phagocytosis, pig mixed infectious diseases.

МЕТОД РЕСТРИКЦИОННОГО АНАЛИЗА ГЕНОМОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ IN SILICO

М.А. АБДУРАШИТОВ, В.Н. ТОМИЛОВ*, В.А. ЧЕРНУХИН, Д.А. ГОНЧАР,
С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Предложен метод получения теоретических картин расщепления хромосомной ДНК млекопитающих эндонуклеазами рестрикции. Основываясь на опубликованных в последнее время данных по первичной структуре геномов, проведен расчет и построены диаграммы распределения фрагментов хромосомной ДНК мыши, крысы и человека, полученных при расщеплении по последовательностям 5'-GGCC-3', 5'-CCGG-3', 5'-GATC-3' и 5'-CC(A/T)GG-3'. Проведены эксперименты по гидролизу хромосомной ДНК эндонуклеазами рестрикции *HaeIII*, *MspI*, *Kzo9I* и *Bst2UI*, имеющими соответствующие сайты узнавания, и показано соответствие между рассчитанными диаграммами и экспериментально полученными картинками рестрикции ДНК.

Ключевые слова: метод, ДНК-повторы, рестрикционный анализ, эукариотический геном, человек, крыса, мышь.

Рестрикционный анализ ДНК широко используется в молекулярно-биологических исследованиях и прикладных работах и является одним из наиболее важных инструментов при изучении ДНК. Как правило, продукты расщепления ДНК анализируются с помощью гель-электрофореза в агарозном или акриламидном геле, а полученная таким образом картина разделения фрагментов ДНК в виде определенного, отличающегося для разных ферментов, набора полос и является результатом рестрикционного анализа той или иной ДНК [1].

Большое разнообразие существующих эндонуклеаз рестрикции (ЭР) позволяет проводить расщепление ДНК по более чем 150 сайтам узнавания [2]. Рестрикционный анализ проводится для самых различных ДНК, начиная от небольших фрагментов длиной несколько десятков нуклеотидных пар и вплоть до целых геномов эукариот размерами более 1 млрд. пар оснований.

Одним из существенных элементов рестрикционного анализа является получение теоретически рассчитанной картины разделения фрагментов ДНК, определяемой на основе известной первичной структуры

данной ДНК. В случае небольших размеров ДНК (до 100000–200000 п.о.) для этих целей обычно используют программное обеспечение *Vector NTI*, *Lasergene*, *Dnasis Max* и т.д., установленное на обычный персональный компьютер класса *Pentium* или *Athlon*. Однако для работы с протяженными эукариотическими ДНК, первичная структура которых была определена за последнее десятилетие, требуются наличие вычислительных центров и специальное программное обеспечение.

В данном исследовании предложен простой метод работы с данными по первичной структуре геномов млекопитающих, позволяющий строить диаграммы распределения фрагментов хромосомной ДНК после ее расщепления по определенным последовательностям и использующий обычный компьютер класса *Athlon 64* и несложное программное обеспечение.

Целью данной работы явилось:

- 1) разработка несложного программного обеспечения для анализа протяженных последовательностей ДНК *in silico*;
- 2) построение теоретических диаграмм распределения фрагментов хромосомной ДНК после ее расщепления по сайтам узнавания ряда рестриктаз на примере геномов крысы, мыши и человека;
- 3) получение экспериментальных данных по гидролизу хромосомных ДНК соответствующими эндонуклеазами рестрикции и сравнение полученных результатов с теоретическими расчетами.

* Автор для переписки:

© 2006 г. Томилов Виктор Николаевич,
сотрудник НПО «СибЭнзим»,
630117 Новосибирск, ул. Ак. Тимакова, 2/12,
Тел./факс: 8-383-333-6853,
E-mail: vicont@sibenzyme.ru

Материалы и методы

Программное обеспечение. Для создания программного обеспечения были использованы: программная среда Borland Delphi (интерфейс, вывод, обработка) и Microsoft C++ compiler (модульная часть расчетов, распараллеливание). Программный продукт был оптимизирован для работы на системах с двумя и более процессорами (расчеты производились на двухъядерном процессоре AMD Athlon64).

Образцы ДНК. В экспериментах использовали крыс-самцов линии SD в возрасте 3–4 мес. и мышей-самцов линии А/He в возрасте 5–6 мес. разведения вивария ИЦиГ СО РАН. Геномная ДНК из печени животных выделялась по методу [3]. Выделение геномной ДНК из лейкоцитов крови человека (женщин-доноров) проводили согласно методике [4]. Выборка полученных данных делалась не менее чем из трех экспериментов.

Перед проведением реакции гидролиза все препараты ДНК обрабатывали рибонуклеазой А (0,1 мг/мл) 10 мин. при комнатной температуре и диализовали в трубках DispoDialyzer MWCO 50,000 («Sigma», США) против 100 объемов буфера TE (10 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА) при 4 °С в течение 20 ч.

Гидролиз ДНК ферментами. В работе использовали ферменты производства НПО «СибЭнзим». Расщепление ДНК проводили в рекомендуемых производителем буферах для рестрикции ДНК при оптимальных температурах в течение 3 ч.

Гидролиз проводили в 40 мкл реакционной смеси, в которую добавляли 6 мкг ДНК и 3 мкл препарата фермента. Активности использованных препаратов ферментов: HaeIII – 20 ед/мкл, Kzo9I – 5 ед/мкл, MspI – 10 ед/мкл, Bst2UI – 10 ед/мкл.

Электрофорез. Для выявления фрагментов длиной от 40 до 500 п.о. использовали электрофорез в 8% полиакриламидном геле (на дорожку наносили 6 мкг гидролизованной ДНК); для разделения фрагментов в диапазоне 200–2000 п.о. (рис. 1а и 1б) использовали 1,5% легкоплавкую агарозу «Low melting point» («Sigma», USA). Для выявления более крупных продуктов гидролиза использовался электрофорез в 1% агарозе «Type I-A, Low EEO» («Sigma», USA); на агарозный гель наносили 3 мкг гидролизованной ДНК на дорожку. Во всех случаях для электрофореза применялся трис-ацетатный буфер. После проведения электрофореза ДНК визуализировали бромистым этидием и фотографировали в УФ-свете.

Результаты и обсуждение

Разработка метода компьютерного анализа и обработка данных. Благодаря улучшению методов определения первичной структуры ДНК за последнее десятилетие была установлена нуклеотидная последовательность всех хромосом целого ряда млекопитающих, включая мышь [5] и крысу [6]. Совсем недавно было в целом завершено определение нуклеотидной последовательности генома человека [7]. Эти данные по первичной структуре ДНК представлены на сайтах Entrez Genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Genome>), EMBL Genomes Pages (<http://www.ebi.ac.uk/genomes/eukaryota.html>) и Ensemble Genome Browser (<http://www.ensembl.org>). На сегодняшний день структура ДНК крысы, мыши и человека определена более чем на 95% и постоянно появляются новые данные, повышающие долю достоверно установленной первичной структуры. В настоящей работе мы использовали данные по последовательностям геномной ДНК крысы, мыши и человека с ресурса <ftp://ftp.ensembl.org/pub/> (версии от 2 июня 2006 года).

При разработке программы для поиска сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции на сверхпротяженных последовательностях ДНК и расчета длин фрагментов, получаемых при расщеплении ДНК по этим сайтам, учитывались следующие особенности:

1. Некоторые эндонуклеазы рестрикции узнают две или более последовательностей ДНК (непалиндромные и/или вырожденные сайты узнавания). В этих случаях поиск проводился для всех возможных сайтов узнавания данных эндонуклеаз рестрикции, включающих лишь основные символы, соответствующие обозначениям нуклеотидных остатков ('A', 'G', 'T', 'C').

2. Существующие в базах данных геномные последовательности представляют собой набор протяженных фрагментов хромосомных ДНК (так называемых «контигов»), длина которых в большинстве случаев не позволяет загружать их в память обычного персонального компьютера целиком. Поэтому последовательности подгружались в оперативную память последовательно, частями, в виде строковых переменных, в которых и проводился поиск сайтов эндонуклеаз рестрикции.

3. Нерасшифрованные до сих пор последовательности геномов, расположенные с обоих краев «контигов» (включая переменные теломерные участки хромосом), не позволяют провести определение всех фрагментов ДНК, получаемых при расщеплении по тем или иным сайтам. Для простоты и ускорения анализа все имею-

щиеся последовательности частей геномов объединялись в одну сверхпротяженную последовательность. В этом случае возможно появление дополнительных, несуществующих реально фрагментов, однако их незначительное количество позволяет предположить допустимость использования такого подхода.

Алгоритм компьютерного моделирования включал в себя следующие стадии:

1. *Анализ сайта узнавания и выбор оптимального метода поиска (в зависимости от вырожденности сайта, то есть количества вырожденных пар оснований и степени их вырожденности).* По результатам анализа сайта узнавания использовались следующие способы поиска: метод прямого поиска, метод подстановки или метод подстановки с обобщенной группировкой.

2. *Ввод данных и поиск сайтов узнавания.* Ввиду слишком большого размера всего генома данные из файла последовательности ДНК генома загружались в память последовательно, без служебных символов. Основной алгоритм: 1) загружал в буфер определенный сегмент данных, 2) проводил оптимизированный поиск в нем с учетом ограниченности пространства элементов ($\{ 'A', 'G', 'T', 'C' \}$ — прямой поиск и $\{ 'A', 'G', 'T', 'C', '*' \}$ — подстановка); 3) в случае успешного поиска (нахождение сайта узнавания в загруженном сегменте) проводил добавление результата и удаление обработанного фрагмента из буфера, или в случае неудачи (сайт не найден) — загружал новый сегмент данных из файла генома с учетом граничного эффекта, то есть участок старого фрагмента длиной $n - 1$ (где n — длина анализируемой последовательности сайта узнавания) добавлялся к новому сегменту.

3. *Расчет длин фрагментов между ближайшими сайтами узнавания, подсчет числа фрагментов для каждой длины в диапазоне 1–6000 п.о. и вычисление общего количества всех п.о. во всех фрагментах заданной длины.* Эти данные выводились в файл в формате CSV (comma separated values) для дальнейшей обработки.

Полученные данные импортировались в таблицы Microsoft Excel и использовались для построения графиков в виде диаграмм.

Таким образом, в процессе моделирования для каждого сайта узнавания рассчитывалось распределение количества фрагментов, получаемых при расщеплении хромосомной ДНК по этим сайтам, от размеров этих фрагментов. При построении графиков значение, откладываемое по оси ординат, определялось как число

пар оснований во всех фрагментах данной длины, и рассчитывалась по формуле

$$S_i = i \cdot n_i,$$

где S_i — суммарное число п.о., i — количество п.о. во фрагменте, n_i — количество фрагментов, содержащих i нуклеотидных пар. Поэтому функция S может рассматриваться как зависимость суммарной массы всех фрагментов длиной i п.о. от длины фрагментов i , выраженной в п.о., то есть как диаграмма распределения. При сравнении с экспериментальными данными значение этой функции пропорционально количеству молекул бромистого этидия, связавшихся с ДНК, и, таким образом, величина S коррелирует с интенсивностью полос на электрофоретическом геле.

На рисунках 1–4 представлены полученные диаграммы распределения значения S_i для фрагментов ДНК крысы (1а, 2а, 3а и 4а), мыши (1б, 2б, 3б и 4б) и человека (1с, 2с, 3с и 4с) при расщеплении по последовательностям 5'-GGCC-3' (рис. 1), 5'-CC(A/T)GG-3' (рис. 2), 5'-GATC-3' (рис. 3) и 5'-CCGG-3' (рис. 4). На диаграммах показаны расчетные данные для диапазона 1–1200 п.о., на врезках — расчетные данные для диапазона 1–6000 п.о. (в уменьшенном масштабе). По оси абсцисс отложены длины фрагментов (п.о.), по оси ординат — суммарное количество п.о. во всех фрагментах данной длины.

Как видно из рисунков, все полученные диаграммы распределения имеют отчетливые экстремумы для определенных длин фрагментов ДНК, размеры которых (в парах оснований) указаны числами над пиками. Размеры фрагментов, имеющих пиковые значения, варьируют от 40–50 п.о., получаемых при расщеплении ДНК человека по последовательностям 5'-CC(A/T)GG-3' и 5'-GGCC-3', и до 5538 п.о. — при расщеплении ДНК мыши по последовательности 5'-CCGG-3'. Величины получаемых пиков также сильно варьируют — от незначительных значений до максимальной высоты около 15000000 п.о., получаемой при расщеплении хромосомной ДНК человека по последовательностям 5'-GATC-3' (фрагменты длиной 174 и 175 п.о.) и 5'-CC(A/T)GG-3' (фрагменты длиной 49 и 50 п.о.). Наличие таких и более мелких пиков на диаграммах, вероятно, связано с существованием так называемых повторов в эукариотических ДНК [8]. Такие повторы имеют размеры от нескольких п.о. (микросателлиты) до 6–7 тыс. п.о. (повторы семейства LINE), и их количество в геноме может достигать 500 и более тысяч [5–7]. Расщепление большого количества таких повторов по коротким последовательностям ДНК будет приводить к появлению

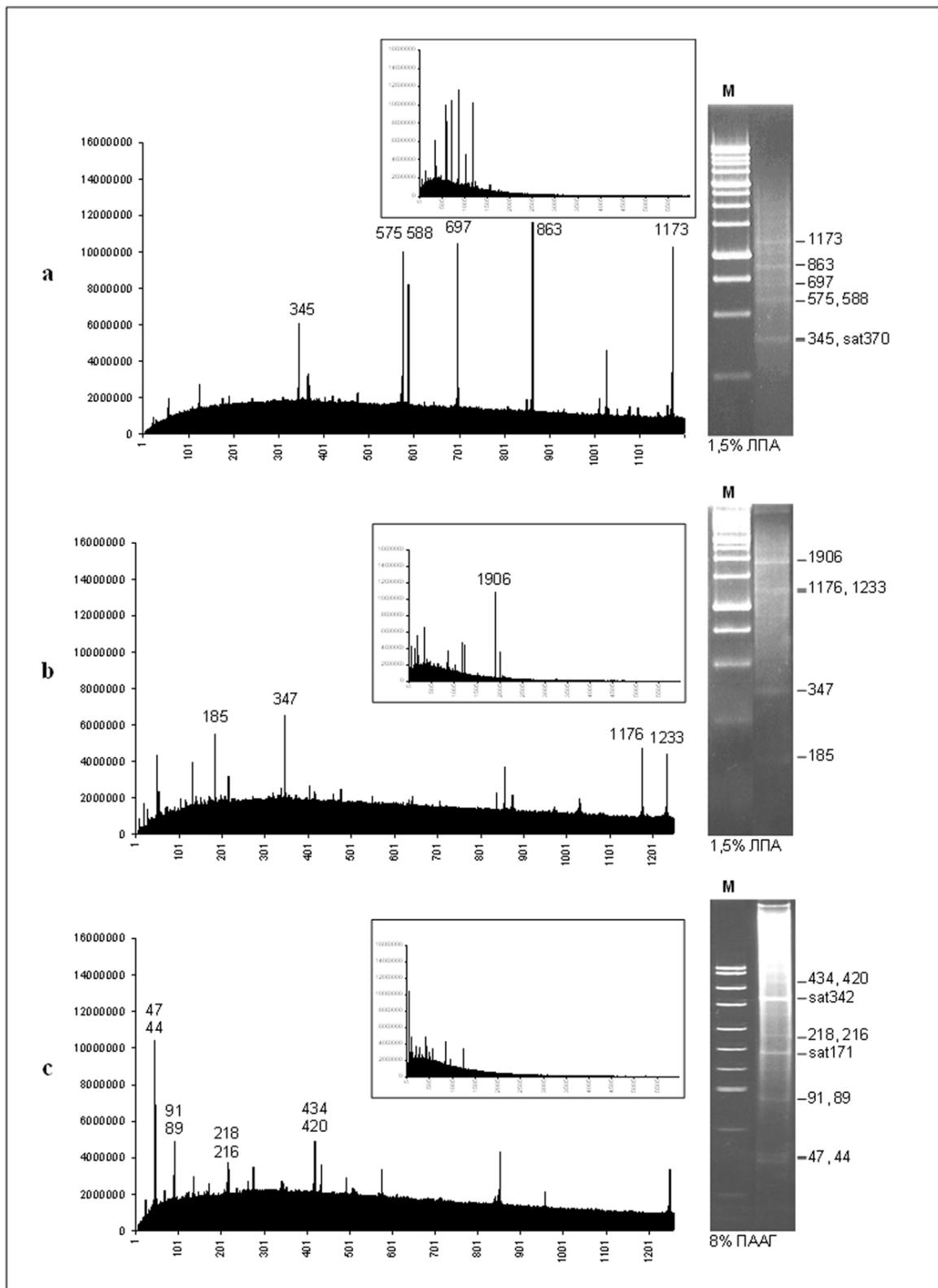


Рис. 1. Диаграмма распределения суммарного количества длин всех фрагментов (выраженное в парах оснований) в зависимости от их размера для расщепления ДНК крысы (а), мыши (б) и человека (с) по последовательности 5'-GGCC-3'. С правой стороны приведены экспериментально полученные электрофореграммы картин расщепления соответствующих ДНК эндонуклеазой рестрикции *NotI* (сайт узнавания 5'-GGCC-3'), снизу указан тип геля и его концентрация. М – маркеры длин фрагментов: для ЛПА использовался «SE 1 kb» (длины фрагментов – 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 2x3000, 2500, 2000, 1500, 2x1000, 750, 500 и 250 п.о.); для ПААГ использовался гидролизат ДНК *pUC19/MspI* (длины фрагментов – 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67, 2x34 п.о.)

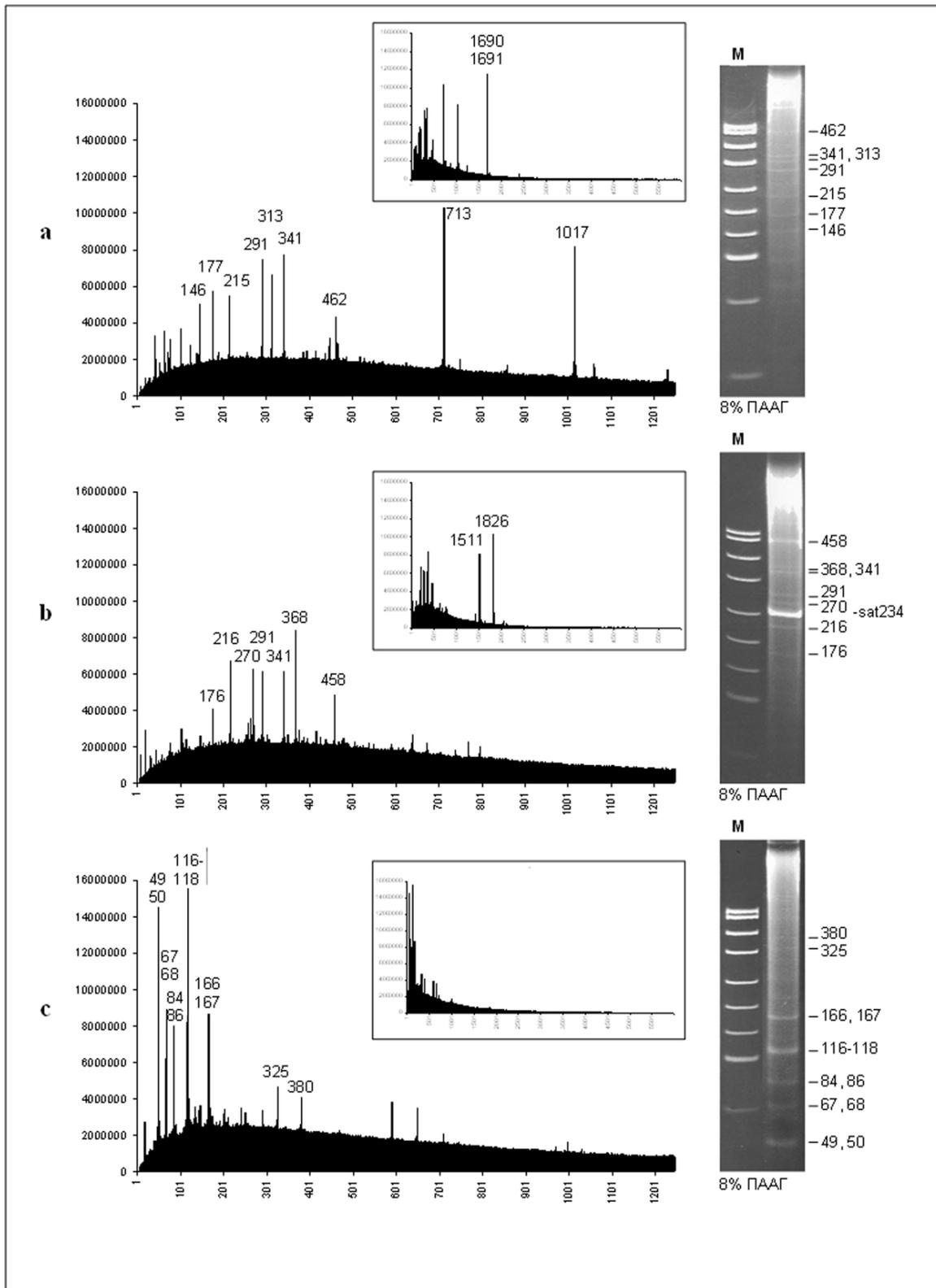


Рис. 2. Диаграмма распределения суммарного количества длин всех фрагментов (выраженное в парах оснований) в зависимости от их размера для расщепления ДНК крысы (а), мыши (б) и человека (с) по последовательности 5'-CC(A/T)GG-3'. С правой стороны приведены экспериментально полученные электрофореграммы картин расщепления соответствующих ДНК эндонуклеазой рестрикции Bst2UI (сайт узнавания 5'-CC(A/T)GG-3'). Остальные обозначения, как на рис. 1

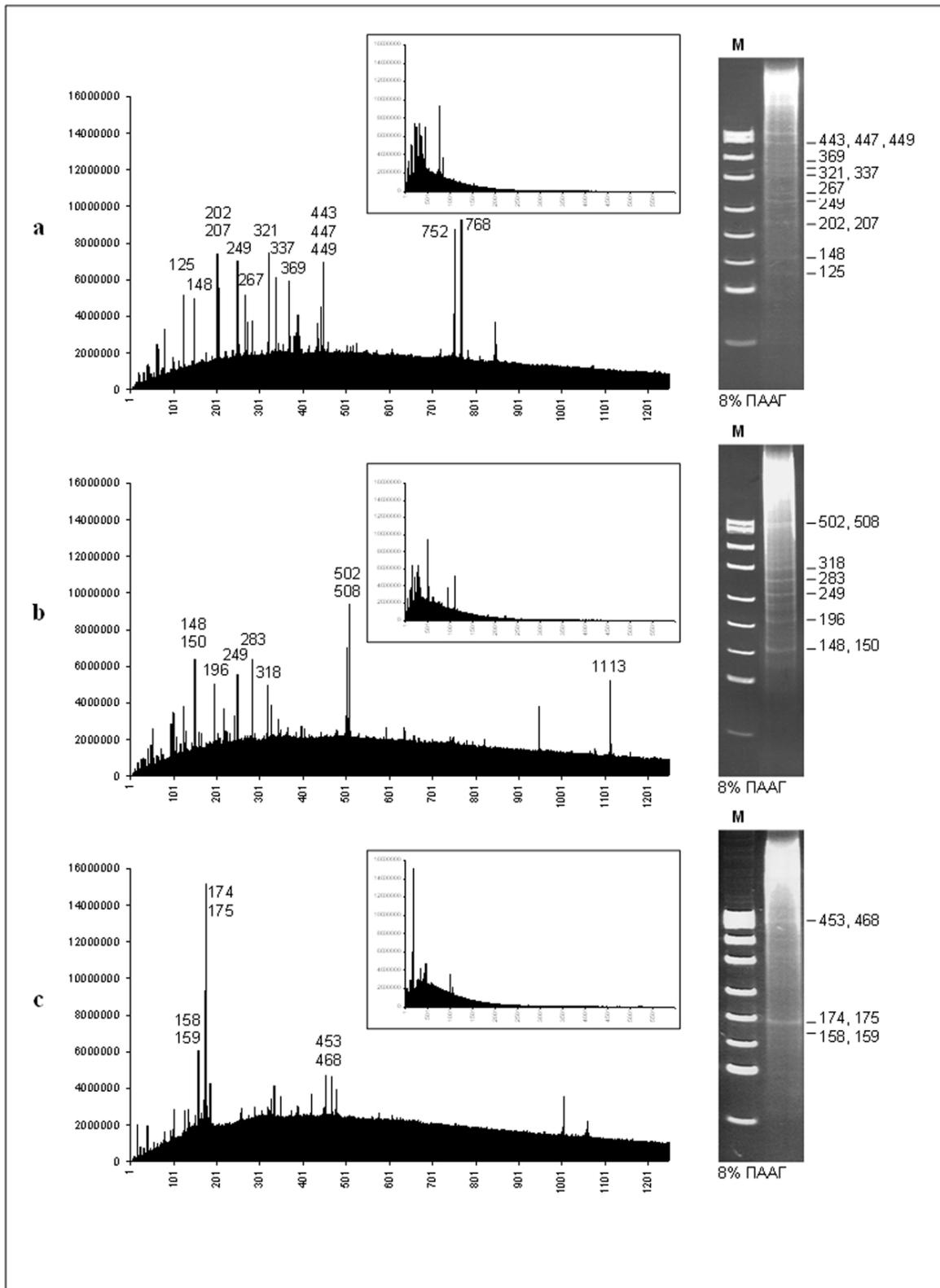


Рис. 3. Диаграмма распределения суммарного количества длин всех фрагментов (выраженное в парах оснований) в зависимости от их размера для расщепления ДНК крысы (а), мыши (б) и человека (с) по последовательности 5'-GATC-3'. С правой стороны приведены экспериментально полученные электрофореграммы картин расщепления соответствующих ДНК эндонуклеазой рестрикции Kzo9I (сайт узнавания 5'-GATC-3'). Остальные обозначения, как на рис. 1

множества фрагментов одинаковой длины. В результате при построении диаграммы мы получаем пики с высотой, пропорциональной количеству повторов того или иного фрагмента, присутствующих в хромосомной ДНК.

Получение диаграмм распределения фрагментов геномной ДНК, по сути, являющееся проведением рестрикционного анализа *in silico*, стало возможным благодаря тому, что нуклеотидные последовательности геномов эукариотических организмов, в частности, геномов крысы, мыши и человека, расшифрованы в значительной степени. Наличие брешей в уже определенной последовательности ДНК, а также возможные ошибки при установлении первичной структуры, не являются критическим моментом в работе, так как эти дефекты не превышают нескольких процентов от установленной структуры ДНК и не могут существенно изменить картину расщепления ДНК из-за большого количества существующих в ней повторов.

Получение экспериментальных картин расщепления хромосомных ДНК. Для изучения применимости предлагаемого метода расчета картин рестрикции нами были получены экспериментальные данные по расщеплению ДНК крысы, мыши и человека эндонуклеазами рестрикции с соответствующими сайтами узнавания.

На рисунке 5 представлены результаты электрофореза в 1% агарозном геле продуктов расщепления ДНК крысы, мыши и человека эндонуклеазами рестрикции Kzo9I (сайт узнавания GATC), HaeIII (GGCC), Bst2UI (CC(A/T)GG) и MspI (CCGG).

Электрофорез в 1% агарозном геле позволяет визуализировать большие фрагменты ДНК, которые видны на рисунке. Для представления картины гидролиза ДНК с фрагментами в диапазоне 200–2000 п.о. (диаграммы распределения на рис. 1а и 1б) мы использовали 1,5% легкоплавкую агарозу (ЛПА). Для получения остальных электрофореграмм и визуализации фрагментов меньших длин применялся электрофорез в 8% полиакриламидном геле (ПААГ). Полученные картины рестрикции ДНК приведены с правой стороны на рисунках 1–3. Как видно из приведенных данных на рисунках 1–3 и 5, в большинстве случаев при расщеплении хромосомных ДНК эндонуклеазами рестрикции образуются отчетливо видимые фрагменты определенной длины. Однако при этом на рисунках 1с и 2б на фоне типичной картины рестрикции ДНК существенно более ярко видны отдельные полосы. По размерам эти фрагменты соответствуют длинам основных повторов в сателлитных ДНК (234 п.о. — мыши [8], 342 п.о. и 171 п.о. — человека [9]). На электрофореграммах, приведенных на рисунках 1 и 2 эти полосы обозначены как «sat».

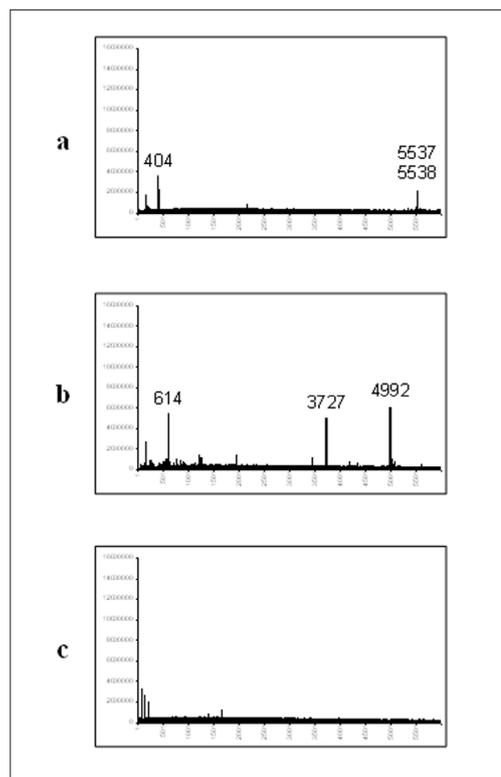


Рис. 4. Диаграмма распределения суммарного количества длин всех фрагментов (выраженное в парах оснований) в зависимости от их размера для расщепления ДНК крысы (а), мыши (б) и человека (с) по последовательности 5'-CCGG-3'

По-видимому, более высокая интенсивность этих полос связана с тем, что многократно повторенные тандемные последовательности, представляющие собой сателлитную ДНК, присутствуют в выделенных препаратах ДНК в количествах, значительно превышающих число повторов в протяженной хромосомной ДНК. При наличии в сателлитной ДНК сайта узнавания действие эндонуклеазы рестрикции приводит к выщеплению фрагментов, соответствующих по длине единичному повтору, а также кратных длине единичного повтора.

Известно, что очистка протяженной хромосомной ДНК больших размеров, в частности, ДНК эукариот, является сложной задачей из-за механического разрушения нитей молекул ДНК при использовании практически всех методик выделения. Тем не менее приведенные на рисунках 1–3 и 5 картины рестрикции показывают, что обычный фенол-хлороформный метод, с помощью которого были выделены все ДНК, вполне может быть использован для получения препаратов ДНК, пригодных для рестрикционного анализа *in vitro*. При этом частичная деградация ДНК, обычно приводящая к размыванию картины рестрикции, в данном случае компенсируется большим числом доминирующих повторов в геномах эукариот.

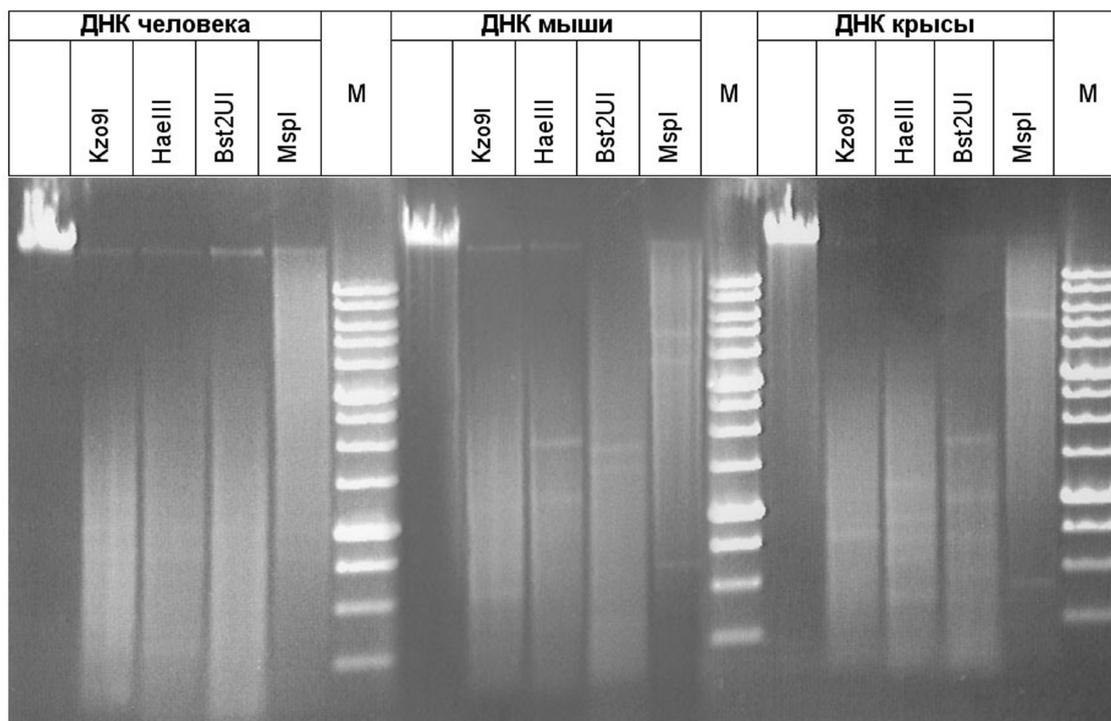


Рис. 5. Картины расщепления ДНК человека, мыши и крысы эндонуклеазами рестрикции Kzo9I (сайт узнавания GATC), HaeIII (GGCC), Bst2UI (CCWGG) и MspI (CCGG). Электрофорез в 1% агарозном геле. Дорожки М — маркер длин фрагментов «SE 1 kВ»

Сравнение теоретически рассчитанных и экспериментальных картин рестрикционного анализа. На рисунке 1 представлены расчетные данные по расщеплению хромосомных ДНК по сайту GGCC. Как видно из рисунков 1 и 5, наблюдается хорошая корреляция между теоретическими и экспериментальными данными. Фрагменты 345, 575–758, 697, 863 и 1173, получаемые при расщеплении хромосомной ДНК крысы, соответствуют фрагментам, видимым на геле, на рисунке 1а. Следует, однако, отметить, что хорошо видная полоса на геле, соответствующая фрагменту 345 п.о., видимо, перекрывается с фрагментом сателлитной ДНК крысы размером 370 п.о. [10].

Диаграмма расщепления мышьиной ДНК содержит 5 фрагментов 185, 347, 1176–1233 и 1906 п.о., из которых только последний фрагмент имеет высокое значение Si и хорошо виден на геле. На фотографии геля также отчетливо видны фрагмент 347 п.о. и дубль фрагментов 1176 и 1223 п.о., тогда как фрагмент 185 п.о. едва различим. Более сложная картина наблюдается при расщеплении ДНК человека, где, помимо расчетных фрагментов с длинами 44–47, 89–91, 216–218, появляются более яркие фрагменты, представляющие собой, видимо, про-

дукты расщепления сателлитной ДНК с размерами 171 и 342 пар оснований (рис. 1с).

Представленные на рисунке 2 данные показывают, что расщепление хромосомной ДНК крысы по последовательности CC(A/T)GG дает более мелкие фрагменты, чем по сайту GGCC, однако все они до размера 462 п.о. видны на полиакриламидном геле. При этом более высокомолекулярные фрагменты (713, 1017 и 1690–1691) видны на агарозном геле на рисунке 5. Расщепление мышьиной ДНК по сайту CC(A/T)GG также дает набор фрагментов, видимых на полиакриламидном геле, и два больших фрагмента 1511 и 1826 п.о., которые видны на рисунке 5. Следует также отметить наличие мощного фрагмента сателлитной ДНК размерами 234 п.о. (рис. 2б). Расщепление ДНК человека по сайту CC(A/T)GG дает уникальный набор из множества мелких фрагментов, которые представлены парами и поэтому особенно отчетливо видны на фотографии геля на рисунке 2с. Корреляция полученных экспериментальных и теоретических результатов наблюдается не только в соответствии количества и длин расчетных и наблюдаемых фрагментов, но и в их интенсивности. Как видно из диаграммы на рис. 2с, интенсивность пары

фрагментов 116, 118 п.о. существенно выше, чем пары фрагментов 166, 167 п.о., что соответствует данным электрофореза.

Представленные на рисунке 3 результаты по моделированию картины расщепления ДНК по сайту GATC дают большой набор мелких фрагментов в случае крысы и мыши, которые можно видеть на фотографии соответствующих гелей. Расщепление хромосомной ДНК человека дает только один существенный пик фрагментов ДНК размерами 174–175 п.о., который четко виден на картине геля.

На рисунке 4 представлены диаграммы расщепления трех ДНК по сайту CCGG, а на рисунке 5 приведена картина гидролиза этих ДНК ферментом MspI (сайт узнавания CCGG). На диаграмме расщепления ДНК крысы выявляются 2 пиковых значения для фрагментов с длинами 404 и 5537–5538 п.о., а соответствующие им полосы также отчетливо видны на снимке геля. Для ДНК мыши расчетные фрагменты наибольшей интенсивности для фермента MspI – 614, 3727 и 4992 п.о., и мы наблюдаем видимые полосы на электрофореграмме, отвечающие этим длинам. При расщеплении человеческой ДНК ферментом MspI фрагментов со значительной интенсивностью нет ни на диаграмме, ни на снимке геля.

Таким образом, как видно из рисунков 1–5, для большей части получаемых экспериментально фрагментов, за исключением фрагментов сателлитной ДНК, их длины соответствуют пиковым значениям на диаграммах, рассчитанным с помощью предложенного метода. В свою очередь, теоретически рассчитанные фрагменты с высоким значением функции Si видны на фотографиях гелей,

Очевидно, что существует некоторое пороговое значение величины функции Si, ниже которого полосы плохо визуализируются на геле. В условиях наших экспериментов пороговое значение для выявления фрагментов составило приблизительно 4 млн. п.о. (приблизительно 0,13–0,16% от всей длины генома). При этом необходимо учитывать, что интенсивность полос на геле, соответствующих фрагментам ДНК с примерно одинаковыми подвижностями, будет усиливаться благодаря эффекту наложения, что наблюдается в случае фрагментов, получаемых при гидролизе ДНК человека ферментом Bst2UI (сайт узнавания CC(A/T)GG). Аналогичный эффект наблюдается для случая гидролиза ДНК крысы рестриктазой MspI, когда высокомолекулярные фрагменты, имеющие на диаграмме значение функции S меньше 4 млн п.о., хорошо видны на геле.

Как видно из приведенных в настоящей работе фотографий гелей и теоретических диаграмм распределения фрагментов ДНК, наблюдается значительная корреляция расчетных данных и экспериментальных результатов. Дополнительные полосы с высокой интенсивностью, хорошо заметные при гидролизе ДНК мыши (рис. 2б, фрагмент 234 п.о.) и ДНК человека (рис. 1с, фрагменты 171 п.о. и 342 п.о.), видны значительно слабее при гидролизе ДНК крысы (рис. 1а, фрагмент 370 п.о.).

В последующих работах будут описаны отдельные исследования по расщеплению геномов крысы, мыши и человека по широкому спектру сайтов узнавания и сравнению полученных данных с экспериментальными результатами по гидролизу препаратов ДНК соответствующими эндонуклеазами рестрикции.

Заключение

В настоящей работе предложен простой метод поиска сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции в последовательностях геномов млекопитающих, позволяющий производить расчет длин и количества образуемых при расщеплении фрагментов ДНК, с последующим построением диаграмм их распределения. Используемое программное обеспечение не требует серверных мощностей и позволяет работать с протяженными нуклеотидными последовательностями длиной в несколько миллиардов п.о. на обычных персональных компьютерах. Мы полагаем, что данный метод окажется полезным в работах по изучению структуры геномов млекопитающих и приведет к существенному расширению списка сайт-специфических эндонуклеаз, применяемых в исследованиях ДНК эукариот. Хотя в своей работе мы ограничились анализом только трех геномов млекопитающих, очевидно, что использование предлагаемого метода рестрикционного анализа *in silico* возможно и в случаях геномов бактерий, грибов, растений и других организмов, для которых определена первичная структура ДНК.

Авторы благодарят к.б.н. Каледина В.И. за помощь в работе с животными и к.б.н. Васильева Г.В. за помощь в выделении ДНК.

Литература

1. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. // Молекулярная биология клетки. – М.: Мир, 1994. – Т. 1. – С. 232–233.

2. Roberts R.J., Vincze T., Posfai J., Macelis D. REBASE – Restriction enzymes and DNA methyltransferases // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – Vol. 33 (Database issue). – D230–D232.
3. Дашкевич В.С., Дымищ Г.М., Салганик Р.И., Уланов Б.П. О дестабилизации вторичной структуры ДНК регенерирующей печени крыс в процессе репликации // *Молекулярная биология.* – 1972. – Т. 6 – № 5. – С. 689–697.
4. Lindblom B., Holmlund G. Rapid DNA purification for restriction fragment length polymorphism analysis // *Gene Anal. Tech.* – 1988. – Vol. 5. – P. 97–101.
5. *Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome* // *Nature.* – 2002. – Vol. 420. – P. 520–562.
6. *Rat Genome Sequencing Project Consortium. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution* // *Nature.* – 2004. – Vol. 428. – P. 493–521.
7. *International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome* // *Nature.* – 2001. – Vol. 409. – P. 860–921.
8. Льюин Б. // *Гены.* – М.: Мир, 1987. – С. 298–308.
9. Willard H.F. Chromosome-specific organization of human alpha satellite DNA // *Am. J. Hum. Genet.* – 1985. – Vol. 37. – P. 524–532.
10. Pech M., Igo-Kemenes T., Zachau H.G. Nucleotide sequence of a highly repetitive component of rat DNA // *Nucleic Acids Res.* – 1979. – Vol. 7. – P. 417–432.

METHOD OF RESTRICTION ANALYSIS OF THE MAMMALS GENOMES IN SILICO

M.A. ABDURASHITOV, V.N. TOMILOV, V.A. CHERNUKHIN, D.A. GONCHAR,
S.Kh. DEGTAREV

SibEnzyme Ltd., Novosibirsk

A theoretical method to obtain the digestion patterns of mammalian chromosomal DNA cleavage with restriction endonucleases was proposed. Based on the recently published data on primary structures of genomes, a computative analysis was performed and diagrams of chromosomal DNA fragments distribution were obtained for DNA cleavages at 5'-GGCC-3', 5'-CCGG-3', 5'-GATC-3' and 5'-CC(A/T)GG-3' sequences. Experiments on chromosomal DNA digestion with HaeIII, MspI, Kzo9I and Bst2UI restriction endonucleases which recognize these sites were carried out. The correspondence of computed diagrams and experimentally obtained restriction patterns was shown.

Keywords: method, repetitive DNA elements, restriction analysis, eukaryotic genome, man, rat, mouse.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ХРОМОСОМНОЙ ДНК КРЫСЫ *IN VITRO* И *IN SILICO*

В.А. ЧЕРНУХИН*, М.А. АБДУРАШИТОВ, В.Н. ТОМИЛОВ, Д.А. ГОНЧАР, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

На основе ранее предложенного метода рестрикционного анализа геномов млекопитающих *in silico* рассчитаны диаграммы распределения фрагментов хромосомной ДНК крысы при ее расщеплении по более чем 25 нуклеотидным последовательностям, являющимся сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции. При проведении рестрикционного анализа *in vitro* получены картины электрофореза в агарозном или полиакриламидном гелях продуктов гидролиза ДНК крысы всеми этими ферментами. Проведено сравнение теоретически рассчитанных диаграмм распределения фрагментов и экспериментально полученных данных по гидролизу ДНК соответствующими эндонуклеазами рестрикции.

Ключевые слова: ДНК-повторы, рестрикционный анализ, эукариотический геном, крысы Спрейг-Доули.

В настоящее время первичная структура ДНК крысы определена более чем на 90% [1] и эти данные постоянно обновляются. В предыдущей работе нами был предложен несложный метод проведения рестрикционного анализа ДНК млекопитающих *in silico* путем построения диаграмм распределения фрагментов, получаемых при расщеплении хромосомной ДНК по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции. Для последовательностей ДНК 5'-CCWGG-3', 5'-GATC-3', 5'-GGCC-3' и 5'-CCGG-3' были получены такие диаграммы расщепления хромосомной ДНК крысы, мыши и человека. Сравнение теоретических расчетов с экспериментальными результатами по гидролизу хромосомных ДНК эндонуклеазами рестрикции Bst2UI, Kzo9I, HaeIII и MspI, имеющими эти сайты узнавания, показало хорошее соответствие картин рестрикции *in vitro* и *in silico* [2]. В данной работе исследовалось расщепление хромосомной ДНК крысы по более широкому спектру сайтов узнавания.

Целью настоящей работы явилось получение диаграмм распределения фрагментов при расщеплении хромосомной ДНК крысы по более чем 25 сайтам узнавания, включая 4-, 5- и 6-нуклеотидные последовательности, и сравнение полученных данных с результатами гидролиза ДНК соответствующими эндонуклеазами рестрикции.

Материалы и методы

Хромосомная ДНК крысы. В экспериментах использовали крыс-самцов линии Спрейг-Доули в возрасте 3–4 месяца разведения вивария ИЦиГ СО РАН. Выделение хромосомной ДНК из печени крыс проводили по методике [3] с некоторыми модификациями, как описано ниже.

Печень крыс немедленно после забоя животного замораживали в жидком азоте. Кусочки ткани переносили в фарфоровую ступку и растирали под слоем жидкого азота до состояния однородного порошка. 0,5–1 г порошка ткани равномерно высыпали в коническую колбу объемом 50 мл, содержащую 5 мл лизирующего буфера (100 мМ ЭДТА рН 8,0; 0,5% SDS; 40 мкг/мкл протеиназы К). Раствор осторожно перемешивали и инкубировали 3 часа при 55 °С.

В колбу добавляли 5 мл фенола, насыщенного 10 мМ Трис-НСI (рН 8,0) и инкубировали при комнатной температуре и постоянном покачивании в течение 15 мин.

Смесь переносили в стакан и центрифугировали на 4000 об/мин. в течение 5 мин. при 20 °С. Верхнюю водную фазу переносили в коническую колбу пипеткой с использованием обрезанного ножницами наконечника. В колбу добавляли 5 мл смеси в равных объемах — фенол (насыщенный 10 мМ Трис-НСI (рН 8,0) и раствор А (смесь хлороформ/изоамиловый спирт в пропорции 24:1) и повторяли экстракцию и центрифугирование, как описано выше, после чего к водной фазе добавляли

* Автор для переписки:

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

5 мл раствора А и еще раз повторяли экстракцию и центрифугирование.

Затем водную фазу помещали в стакан объемом 50 мл и охлаждали на льду. При медленном помешивании тонкой стеклянной палочкой к водной фазе добавляли по каплям охлажденный до 0 °С изопропанол. В момент резкого уменьшения вязкости раствора добавление изопропанола прекращали.

Геномную ДНК в виде вязких гелеобразных нитей собирали, «наматывая» на стеклянную палочку. Палочку с ДНК осторожно промывали 70% этанолом и подсушивали в слабом токе стерильного воздуха 3–6 мин., не допуская полного высыхания. После подсушивания палочку в стерильных условиях помещали в 1–1,5 мл буфера ТЕ (10 mM Трис-НСl pH 7,0; 1 mM ЭДТА) в пробирки объемом 1,5 мл. Растворение проводили при 4 °С в течение 1 суток.

Гидролиз хромосомной ДНК. В работе использовали следующие эндонуклеазы рестрикции производства НПО «СибЭнзим» (в скобках указан сайт узнавания соответствующей рестриктазы):

1) PvuII (5'-CAGCTG-3'), 2) VspI (5'-ATTAAT-3'), 3) PciI (5'-ACATGT-3'), 4) Ksp22I (5'-TGATCA-3'), 5) HindIII (5'-AAGCTT-3'), 6) EcoRI (5'-GAATTC-3'), 7) Bpu10I (5'-CCTNAGC-3' и 5'-GCTNAGG-3'), 8) PctI (5'-GAATGC-3' и 5'-GCATTC-3'), 9) Bse3DI (5'-GCAATG-3' и 5'-CATTGC-3'), 10) SfaNI (5'-GCATC-3' и 5'-GATGC-3'), 11) Bse21I (5'-CCTNAGG-3'), 12) BstV2I (5'-GAAGAC-3' и 5'-GTCTTC-3'), 13) Bst6I (5'-CTCTTC-3' и 5'-GAAGAG-3'), 14) MspI (5'-CCGG-3'), 15) AluI (5'-AGCT-3'), 16) Kzo9I (5'-GATC-3'), 17) TaqI (5'-TCGA-3'), 18) RsaI (5'-GTAC-3'), 19) FatI (5'-CATG-3'), 20) Tru9I (5'-TTAA-3'), 21) Sse9I (5'-AATT-3'), 22) BstDEI (5'-CTNAG-3'), 23) HaeIII (5'-GGCC-3'), 24) AspS9I (5'-GGNCC-3'), 25) Fsp4HI (5'-GCNGC-3'), 26) BspAC (5'-CCGC-3' и 5'-GCGG-3'), 27) HpaII (5'-CCGG-3'), 28) HspAI (5'-GCGC-3'), 29) BstFN (5'-CGCG-3').

ДНК в количестве 6 мкг расщепляли в 40 мкл реакционной смеси в рекомендуемых производителем SE-буферах для рестрикции ДНК при оптимальных температурах в течение 3 ч.

Электрофорез. Для разделения фрагментов ДНК длиной от 40 до 600 п.о. использовали электрофорез в 8% ПААГ в камере Hoefer SE 600/SE 660 (Amersham USA). Толщина используемого геля — 1,5 мм, длина — 140 мм. На гель наносили 6 мкг гидролизованной

ДНК на дорожку. Электрофорез проводили в течение 5 часов при напряжении 140 В.

Для выявления более крупных продуктов фрагментов ДНК в диапазоне 500–10000 п.о. использовался электрофорез в 1% агарозе «Type I-A, Low EEO» («Sigma», USA), при этом на гель наносили 3 мкг гидролизованной ДНК на дорожку.

Во всех случаях для электрофореза применяли трис-ацетатный буфер (40 mM Трис-ацетат, pH 8,0, 1 mM ЭДТА). После проведения электрофореза ДНК визуализировали бромистым этидием и фотографировали в УФ-свете.

Данные о нуклеотидной последовательности. Последовательность ДНК крысы была получена с ресурса <ftp://ftp.ensembl.org/pub/> (версия от 2 июня 2006 года).

Программное обеспечение. Построение диаграмм распределения фрагментов, получаемых при расщеплении ДНК по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции, в виде зависимости суммарной массы фрагментов фиксированной длины, выраженной в парах оснований, от длины фрагментов (в парах оснований) проводили по методике, описанной нами ранее [2].

Результаты и обсуждение

Ранее нами были получены диаграммы распределения фрагментов при расщеплении хромосомной ДНК крысы по сайтам узнавания рестриктаз HaeIII (5'-GGCC-3'), MspI (5'-CCGG-3'), Kzo9I (5'-GATC-3') и Bst2UI (5'-CCWGG-3') и показано хорошее соответствие между расчетными данными и результатами экспериментов по гидролизу ДНК этими ферментами [2]. В настоящей работе мы проводили построение диаграмм распределения фрагментов, получаемых при расщеплении хромосомной ДНК крысы по более широкому спектру сайтов узнавания, включая и шестинуклеотидные последовательности. При этом, в соответствии с предложенным ранее методом [2], диаграммы распределения строились с использованием арктангенсоидной шкалы, имитирующей разделение получаемых фрагментов электрофорезом в агарозном геле. На рисунке 1а приведены диаграммы расщепления ДНК в основном по шестинуклеотидным последовательностям, являющимся сайтами узнавания как хорошо известных ферментов (HindIII и EcoRI), так и редко используемых (SfaNI и другие). Для представления на рисунке были выбраны только те диаграммы, которые характеризуются наличием пиков высотой 5,5 и более млн. пар оснований,

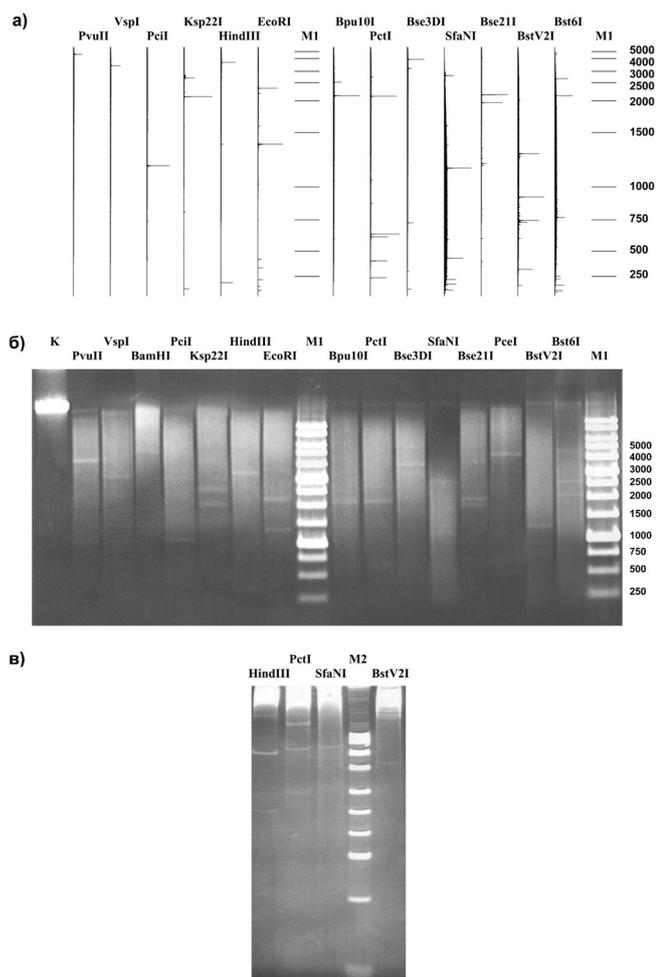


Рис. 1.

а) Диаграммы распределения фрагментов ДНК, получаемых при расщеплении геномной ДНК крысы по нуклеотидным последовательностям, являющимся сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции. Название каждого фермента указано над соответствующей диаграммой. В центре и справа приведены рассчитанные электрофореграммы распределения маркеров молекулярных масс фрагментов ДНК.

б) Анализ продуктов расщепления хромосомной ДНК крысы эндонуклеазами рестрикции. Электрофорез в 1% агарозе. Название эндонуклеазы рестрикции указано над дорожкой геля; M1 – маркер длин фрагментов SE 1kb.

в) Анализ продуктов расщепления хромосомной ДНК крысы эндонуклеазами рестрикции. Электрофорез в ПААГ. Название эндонуклеазы рестрикции указано над дорожкой геля; M2 – маркер длин фрагментов ρUC19/MspI

что, как было показано ранее [2], является пороговой величиной для появления соответствующих полос при анализе продуктов расщепления ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле. В таблице 1 собраны данные

по 26 таким пиковым фрагментам. Как видно из данной таблицы, в большинстве случаев наличие пиков такой высоты объясняется присутствием нескольких фрагментов с размерами, отличающимися на 1–2 нуклеотида, для которых, в соответствии с предложенным методом [2], и вычислялось суммарное значение высоты пика. Образование кластеров таких фрагментов, минимально отличающихся друг от друга размерами, связано, по-видимому, с делециями и инсерциями в повторах ДНК [4], при расщеплении которых и образуются полосы ДНК, видимые на агарозных и акриламидных гелях [2, 5, 6, 7]. Непосредственный анализ ДНК-повторов представляется более простым методом получения картины рестрикции *in silico*, однако ввиду достаточно высокой вариабельности нуклеотидной последовательности в этих участках ДНК, его применение едва ли корректно. Для сравнения мы провели анализ усредненной первичной структуры наиболее полного (6914 п.о.) LINE1 повтора ДНК крысы [8], имеющейся в базе данных ДНК-повторов [<http://www.girinst.org/repbase/>] и эти данные представлены в последнем столбце таблицы 1. Как видно из таблицы, наблюдается достаточно высокое соответствие данных, полученных при анализе геномной ДНК и LINE1 повтора. Однако для ряда сайтов расчетные данные, полученные предложенным нами методом, отличаются от данных анализа LINE1 повтора. В частности, в последнем случае оказался пропущенным один из VspI сайтов; наблюдается отличие в размерах PvuII фрагмента и верхних фрагментов Ksp22I и SfaNI гидролизатов ДНК. Кроме того, анализ LINE1 повтора не позволяет оценить количество получаемых фрагментов ДНК и тем самым предсказать их визуализацию в эксперименте. Например, низкомолекулярные фрагменты в гидролизатах EcoRI, SfaNI, BstV2I и ряда других ферментов, получаемые при анализе LINE1 повтора, дают невысокие пики в диаграммах и, как будет показано в дальнейшем, не видны на фотографиях электрофореграмм.

На рисунке 1б приведены экспериментальные данные по рестрикционному анализу хромосомной ДНК крысы *in vitro*.

Сравнение расчетных данных в третьем столбце таблицы 1 с экспериментальными результатами показывает, что все указанные фрагменты присутствуют в виде полос на фотографии агарозного геля. В частности, экспериментально наблюдается наличие полос соответствующей молекулярной массы при гидролизе ДНК крысы ферментами PvuII, VspI, PciI, Ksp22I, HindIII, EcoRI, Bpu10I, PctI, Bse3DI, SfaNI, Bse21I, BstV2I и Bst6I.

Таблица 1

Расчетные длины фрагментов, образующихся при расщеплении геномной ДНК крысы по различным последовательностям нуклеотидов, являющимся сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции

Эндонуклеаза рестрикции	Сайт узнавания	Длины пиковых фрагментов, п.о.	Длины фрагментов, получаемых при расщеплении повтора L1_RN
PvuII	CAGCTG	4549,4550	4685
VspI	ATTAAT	3361,3362	_*
PciI	ACATGT	1171,1172	1172
Ksp22I	TGATCA	2678,2679 2094,2095	2814, 2095 , 101
HindIII	AAGCTT	3626,3627 179**	3627 , 179
EcoRI	GAATTC	2316,2317,2318 1372,1373	2318 , 1373 , 213, 131, 83, 66, 66
Bpu10I	CCTNAGC	2116,2117	2117
PctI	GAATGC	2105,2106 641, 619 413 236	2106 , 641 , 625, 413 , 236
Bse3DI	GCAATG	3908,3909	3917, 96
SfaNI	GCATC	2786,2787 1151 437	2922, 1170, 418, 161, 85, 76
Bse21I	CCTNAGG	2140,2142 1960,1961,1962	2142 1962 , 1325
BstV2I	GAAGAC	1279,1280 924 747 327	1266 924 , 867 761, 605, 327 , 158
Bst6I	CTCTTC	2656,2657 2115,2116	2657 2116 , 904, 362, 224, 147, 52

Примечание:

* в консенсусной последовательности повтора L1_RN имеется только один сайт VspI.

** фрагмент с пиковым значением 4,7 млн. п.о.

Жирным шрифтом в 4-м столбце выделены фрагменты, либо совпадающие, либо отличающиеся на 1–2 нуклеотида от соответствующих фрагментов, указанных в 3-м столбце

На рисунке 16 на дорожках 4 и 15 представлены картины гидролиза хромосомной ДНК ферментами *VamNI* и *PceI*, соответственно. Эти ферменты отсутствуют в таблице 1, так как расщепление по сайтам узнавания *VamNI* и *PceI* не дает диаграмм с высокими пиковыми значениями. Однако, как видно из рисунка 16, гидролиз ДНК этими ферментами также приводит к появлению полосы ДНК на электрофореграмме в районе 4500–5000 п.о., особенно хорошо заметной в случае *PceI*. Кроме того, на дорожке 17 при гидролизе ДНК ферментом *Bst6I* заметно наличие дополнительной полосы в районе 4500–5000 пар оснований, представленной небольшим пиком на рисунке 1 и потому отсутствующей в таблице 1.

Детальный анализ диаграмм расщепления ДНК по сайтам узнавания ферментов *VamNI*, *Bst6I* и *PceI* показывает, что во всех трех случаях в области 4500–5000 пар оснований располагается сразу несколько фрагментов, различающиеся размерами в пределах 200 п.о. и имеющие невысокие пиковые значения (данные не приводятся). В этом случае появление полосы на геле, вероятно, связано с невысокой разрешающей способностью электрофореза для фрагментов размерами 4500–5000 пар оснований и может быть следствием перекрытия нескольких небольших пиков. Этим же можно объяснить утолщение верхней полосы, соответствующей фрагментам 2678–2679 п.о., при гидролизе ДНК ферментом *Ksp22I*.

Из таблицы 1 видно, что, согласно полученным диаграммам, среди продуктов расщепления ДНК крысы ферментами *HindIII*, *PctI*, *SfaNI* и *BstV2I* есть низкомолекулярные фрагменты. Для их анализа проводился электрофорез в ПААГ, который, кроме того, позволяет визуализировать фрагменты с меньшим пиковым значением, так как на дорожку в геле наносится большее количество ДНК. На рисунке 1в представлены полученные электрофореграммы разделения в ПААГ продуктов гидролиза ДНК крысы эндонуклеазами рестрикции *HindIII*, *PctI*, *SfaNI* и *BstV2I*. Расщепление ДНК ферментом *HindIII* приводит к образованию фрагмента 179 п.о., присутствующего в таблице 1, и дополнительного фрагмента размерами 370 пар оснований, образуемого при гидролизе сателлитной ДНК, в которой имеется сайт узнавания фермента *HindIII* [6]. На рисунке 1в. видны также все остальные низкомолекулярные фрагменты, присутствующие в 3-м столбце таблицы 1. *PctI* образует дубль 641 и 619, а также фрагменты 413 и 236 пар оснований, *SfaNI* выщепляет фрагмент 437 пар оснований и *BstV2I* — фрагмент 327 пар оснований. Другие

низкомолекулярные фрагменты, которые дает анализ *LINE1* повтора для сайтов узнавания данных ферментов, в эксперименте не обнаруживаются, что свидетельствует не в пользу использования данных по повторам при построении диаграмм расщепления ДНК.

На рисунке 2а изображены диаграммы расщепления ДНК в основном по четырехнуклеотидным последовательностям ДНК, а числами на них указаны размеры фрагментов с пиковыми значениями более 5,5 млн п.о. По сравнению с диаграммами на рисунке 1, в данном случае наблюдается образование существенно большего количества фрагментов ДНК, что приводит к появлению базовой кривой распределения фрагментов и пиков на ее фоне. Образование пиков, как было показано выше, связано с расщеплением *LINE1* повторов, тогда как появление базовой кривой — результат расщепления остальной геномной ДНК. Вид этой кривой варьируется в зависимости от анализируемой нуклеотидной последовательности, а для сайтов узнавания ферментов *AluI*, *FatI*, *Tfu9I*, *Sse9I* и *BstDEI* количество фрагментов в диапазоне длин от 50 до 500 п.о. существенно выше, чем для остальных.

На рисунке 2б представлены результаты электрофореза продуктов гидролиза ДНК крысы эндонуклеазами рестрикции с сайтами узнавания, представленными на рисунке 2а. Из сравнения рисунков 2а и 2б видно, что появление базовой кривой распределения фрагментов на диаграммах коррелирует с наличием областей окрашенного пятна ДНК на соответствующих фотографиях гелей. Образование такого пятна затрудняет визуализацию отдельных фрагментов ДНК, имеющих пиковые значения на диаграммах. В связи с этим на диаграммах на рисунке 2а числами обозначены размеры только тех фрагментов, которые находятся вне таких затемнений. Сравнение данных, приведенных на рисунках 2а и 2б, показывает, что наблюдается соответствие более чем 25 пиковых значений длин фрагментов, полученных на диаграммах, и полос, видимых на фотографии геля. В частности, как ранее было показано нами [2], при гидролизе ферментами *MspI* и *HaeIII* появляются хорошо различаемые полосы, соответствующие пикам 5537+5538 и 404+405 п.о. в первом случае, и 1173, 863, 697, 575+588, а также 370 п.о. (сателлитная ДНК) — во втором случае. При обработке ДНК ферментами *AluI*, *Kzo9I* и *TaqI* заметно появление полос, соответствующих фрагменту 1127 п.о., двойному фрагменту 752 и 768 п.о. и двоянному пику 1187 и 1233 п.о., соответственно. Гидролиз ДНК ферментами *RsaI*, *FatI* и *Tfu9I* дает по несколько слабых полос, соответствующих пикам 1650, 989, 802 и 555 в первом случае, 1007 и 832 п.о. — во втором случае и 703; 573–575 и

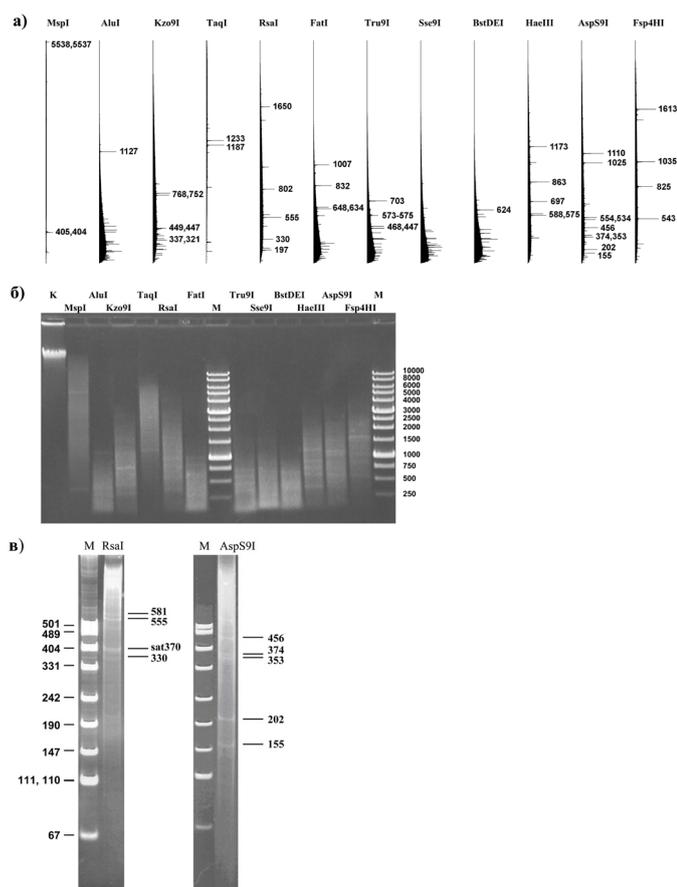


Рис. 2.

а) Диаграммы распределения фрагментов ДНК, получаемых при расщеплении геномной ДНК крысы по нуклеотидным последовательностям, являющимся сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции. Название каждого фермента указано над соответствующей диаграммой. В центре и справа приведены рассчитанные электрофореграммы распределения маркеров молекулярных масс фрагментов ДНК.

б) Анализ продуктов расщепления хромосомной ДНК крысы эндонуклеазами рестрикции. Электрофорез в 1% агарозе. Название эндонуклеазы рестрикции указано над дорожкой геля. М1 — маркер длин фрагментов SE 1kb.

в) Электрофорез хромосомной ДНК крысы в ПААГ после обработки эндонуклеазами рестрикции RsaI и AspS9I. М — маркер длин фрагментов ρUC19/MspI

447–468 — в третьем. Гидролиз ДНК ферментами Sse9I и BstDEI не дает четко определяемых полос ввиду их перекрытия с пятном низкомолекулярных фрагментов. Расщепление ферментом AspS9I приводит к появлению дискретных полос, соответствующих пикам 1025+1100 п.о. и 534+554 п.о., а фермент Fsp4HI дает фрагмент 1613 п.о. и менее заметные фрагменты 1463, 1035, 825 и 543 п.о. Как видно на рисунке 2а, невысокие значения базовой кривой в районе меньше 600 п.о., необходимые

для визуализации фрагментов в ПААГ, наблюдаются при расщеплении ДНК по сайтам узнавания ферментов AspS9I, Fsp4HI, HaeIII, Kzo9I, MspI, RsaI и TaqI.

Результаты электрофореза в ПААГ продуктов расщепления хромосомной ДНК крысы ферментами HaeIII, Kzo9I и MspI были получены и обсуждались нами ранее [2]. В случае остальных ферментов соответствующие пики на диаграммах есть только при расщеплении ДНК ферментами AspS9I и RsaI. На рисунке 2в представлены данные электрофореза в ПААГ продуктов расщепления ДНК крысы ферментами AspS9I и RsaI. В первом случае видны полосы, соответствующие фрагментам 456, 374, 353, 202 и 155 п.о., а во втором — 581, 555 и фрагмент сателлитной ДНК длиной 370 п.о. [6].

Как видно из приведенных на рисунке 2б данных, расщепление ДНК рестриктазами TaqI, RsaI и FatI, имеющими сайты узнавания с одинаковым GC составом, приводит к различной глубине гидролиза и расположению пятна ДНК. Соответственно базовые кривые для сайтов узнавания этих ферментов на рисунке 2а также существенно отличаются друг от друга.

Можно выделить несколько особенностей хромосомной ДНК крысы, от которых зависит глубина гидролиза рестриктазами с одинаковым набором нуклеотидов в сайте узнавания.

1. *Блокирование гидролиза геномной ДНК метилированием CG-динуклеотидов.* По имеющимся оценкам, в геномах млекопитающих 70–80% всех CG-пар метилировано [9]. На рисунке 3 приведены результаты расщепления ДНК эндонуклеазами рестрикции, содержащими динуклеотид CG в сайте узнавания, в частности, ферментами BspACI (5'-CCGC-3' и 5'GCCG-3'), BstFNI (5'-CGCG-3'), HspAI (5'-GCCG-3'), HpaII и MspI (5'-CCGG-3'). Как видно из рисунка, ферменты BspACI, BstFNI, HspAI и HpaII расщепляют геномную ДНК незначительно, тогда как MspI, который способен расщеплять сайт 5'-CmCGG-3', существенно гидролизует ДНК. Таким образом, из всех проанализированных нами ферментов с CG-динуклеотидом в составе сайта узнавания только MspI и TaqI, который также нечувствителен к метилированию цитозина в сайте узнавания, эффективно расщепляют хромосомную ДНК (рис. 2б и 3).

Кроме того, гидролиз ДНК некоторыми ферментами может быть затруднен в результате перекрытия сайта узнавания с CG-метилированным динуклеотидом. Так, при обработке сателлитной ДНК крысы часть сайтов узнавания ферментов HinfI (5'-GANTC-3') и EcoRI (5'-GAATTC-3') содержит метилированный цитозин и

такой сайт гидролизуются с существенно меньшей скоростью, чем немодифицированный сайт узнавания [5].

2. *GC-состав. Геномная ДНК крысы является АТ-богатой и доля GC-пар составляет 40% [10].* Поэтому более глубокий гидролиз должен наблюдаться для рестриктаз, у которых в сайте узнавания доля GC-пар меньше. Как видно из рисунка 2, *Tru9I* и *Sse9I*, у которых в сайте узнавания содержатся только АТ-пары, дают более глубокий гидролиз, чем *ЭР*, содержащие в сайте узнавания только GC-пары (например, *HaeIII* и *Asp9I*).

3. *Наличие в сайте узнавания высокочастотных и низкочастотных динуклеотидов.* Частота встречаемости некоторых динуклеотидных пар существенно отличается от средней статистически ожидаемой. Этим можно объяснить различие средней длины образуемых рестрикционных фрагментов при гидролизе ДНК ферментами, у которых сайт узнавания имеет один и тот же GC-состав.

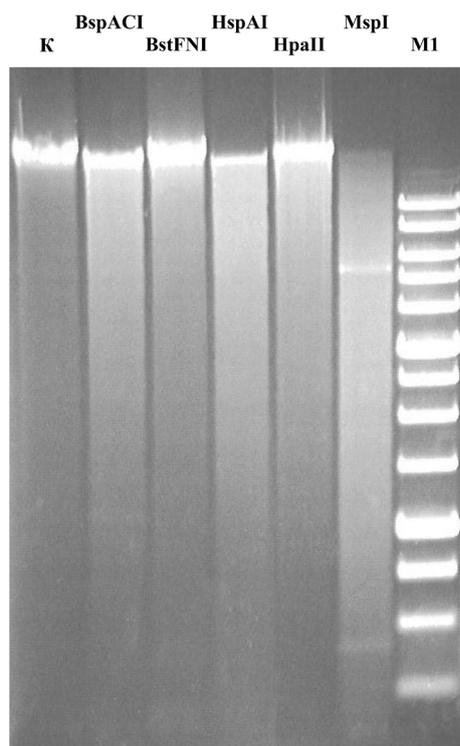


Рис. 3. Расщепление геномной ДНК крысы эндонуклеазами рестрикции с сайтами узнавания, содержащими CG-динуклеотид. Название эндонуклеазы рестрикции указано над дорожкой геля. M1 – маркер длин фрагментов SE 1kb.

Так, при гидролизе ДНК эндонуклеазой рестрикции *TaqI* (сайт узнавания TCGA) глубина гидролиза хромосомной ДНК существенно меньше, чем при гид-

ролизе ферментами *Kzo9I* (GATC) и *RsaI* (GTAC), хотя GC-состав сайтов узнавания всех этих ферментов одинаков. Этот результат можно объяснить тем, что в хромосомных ДНК эукариот частота встречаемости динуклеотида CG в пять раз ниже по сравнению со статистически ожидаемой частотой [11]. Низкая частота встречаемости CG-пары обусловлена, по-видимому, высокой скоростью перехода образующегося в этом динуклеотиде 5-метилцитозина в тимин в результате реакции спонтанного дезаминирования [12].

Аналогичным образом можно объяснить различие в глубине гидролиза ДНК ферментами *HaeIII* (сайт узнавания 5'-GGCC-3') и *MspI* (сайт узнавания 5'-CCGG-3') на рисунке 16. Действительно, хотя последовательности узнавания обоих ферментов состоят только из GC-пар, в сайте узнавания *MspI* присутствует низкочастотный динуклеотид CG, наличие которого приводит к меньшей глубине гидролиза ДНК ферментом *MspI* чем рестриктазой *HaeIII*.

Обратная ситуация наблюдается для динуклеотидов TG, CA, AG и CT. Эти динуклеотиды в хромосомной ДНК эукариот представлены с более высокой частотой по сравнению со среднестатистическим значением встречаемости [13, 14]. Этим можно объяснить глубокий гидролиз, который наблюдается на рисунке 26 для ферментов *FatI* (сайт узнавания CATG), *AluI* (сайт узнавания AGCT) и *BstDEI* (сайт узнавания CTNAG). В сайте узнавания этих эндонуклеаз рестрикции находятся сразу по два высокочастотных динуклеотида (CA и TG – для *FatI*, AG и CT – для *AluI* и *BstDEI*).

Заключение

Для широкого спектра последовательностей узнавания эндонуклеаз рестрикции получены диаграммы расщепления хромосомной ДНК крысы, а также проведены эксперименты по гидролизу ДНК соответствующими ферментами. Теоретически показано существование более чем 50 пиковых значений фрагментов (или кластеров фрагментов) ДНК при расщепления по 25 нуклеотидным последовательностям, являющимся сайтами узнавания рестриктаз. Установлено, что предложенный метод расчета позволяет получать более достоверные картины рестрикции ДНК крысы *in silico*, чем прямой анализ обобщенной первичной структуры ДНК-повтора LINE1. Эксперименты по электрофоретическому разделению продуктов гидролиза ДНК эндонуклеазами рестрикции проводились в агарозном или акриламидном геле, в зависимости от полученной диаграммы. Проведенное в

работе сравнение рассчитанных диаграмм распределения фрагментов ДНК крысы и полученных картин рестрикционного анализа ДНК соответствующими ферментами показывает хорошее соответствие полученных теоретических и экспериментальных данных.

Авторы благодарят к.б.н. Каледина В.И. за помощь в работе с животными и к.б.н. Васильева Г.В. за помощь в выделении ДНК.

Литература

1. *Rat Genome Sequencing Project Consortium. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution // Nature. — 2004. — Vol. 428. — P. 493–521.*
2. Томилов В.Н., Чернухин В.А., Абдурашитов М.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. Метод рестрикционного анализа геномов млекопитающих *in silico* // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2006 — Т. 2. — № 3. — С. 29–38.
3. Дашкевич В.С., Дымищ Г.М., Салганик Р.И., Уланов Б.П. О дестабилизации вторичной структуры ДНК регенерирующей печени крыс в процессе репликации // Молекулярная биология. — 1972. — Т. 6. — № 5. — С. 689–697.
4. Southern E.M. Base sequence and evolution of guinea-pig alpha-satellite DNA // *Nature (Lond)*. — 1970. — Vol. 227. — P. 794–798.
5. Philippsen P., Streeck R.E., Zachau H.G. Defined fragments of calf, human, and rat DNA produced by restriction nucleases // *European J. of Biochemistry* — 1974. — Vol. 45. — P. 479–488.
6. Pech M., Igo-Kemenes T., Zachau H.G. Nucleotide sequence of highly repetitive component of rat DNA // *Nucl. Acids Res.* — 1979. — P. 417–432.
7. Horz W., Hess I., Zachau H.G. Highly regular arrangement of restriction nuclease sensitivity site in rodent satellite DNAs // *European J. of Biochemistry*. — 1974. — Vol. 45. — P. 501–512.
8. Soares, M.B., Schon, E., Efstratiadis A. Rat LINE1: The origin and evolution of long interspersed middle repetitive DNA elements // *J. of Molecular Evol.* — 1985. — Vol. 22. — P. 117–133.
9. Ehrlich M., Gama S.M., Huang L.H., Midgett R.M., Kuo K.C., McCune R.A., and Gehrke C. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells // *Nucl. Acids Res.* — 1982. — Vol. 10. — P. 2709–2721.
10. Калинин Ф.Л., Лобов В.П., Жидков В.А. Справочник по биохимии. — Киев: Наукова думка, 1971.
11. Schorderest D.F., and Gartler S.M. Analysis of CpG suppression in methylated and nonmethylated species // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1992. — Vol. 89. — P. 957–961.
12. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature.* — 1993. — Vol. 362. — P. 709–715.
13. Ohno S. Universal rule for coding sequence construction: TA/CG deficiency-TG/CT excess // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1988. — Vol. 85. — P. 9630–9634.
14. Yomo T., Ohno S. Concordant evolution of coding and noncoding regions of DNA made possible by the universal rule of TA/CG deficiency-TG/CT excess // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1989. — Vol. 86. — P. 8452–8456.

Принятые сокращения

ЭР — эндонуклеаза рестрикции,
п.о. — пара оснований,
ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота,
ПААГ — полиакриламидный гель.

COMPARATIVE RESTRICTION ANALYSIS OF THE RAT CHROMOSOME DNA CLEAVAGE IN VITRO AND IN SILICO

V.A. CHERNUKHIN, M.A. ABDURASHITOV, V.N. TOMILOV, D.A. GONCHAR,
S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme Ltd., Novosibirsk

Theoretical diagrams of Sprague-Dawley rat chromosomal DNA cleavage in more than 25 different nucleotide sequences has been obtained based on earlier proposed method of mammalian genome restriction analysis *in silico*. Restriction analysis *in vitro* has been performed to get DNA digestions by restriction endonucleases with respective recognition sequences. Comparison of theoretical DNA cleavage diagrams and experimental patterns of DNA hydrolysis with restriction endonucleases has been done.

Keywords: repetitive DNA elements, restriction analysis, eukaryotic genome, Sprague-Dawley rats.

ИНДУКЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ГЛИОКСИЛАТНОГО ЦИКЛА В ОРГАНАХ КРЫСЫ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

И.Г. МОРГУНОВ^{1*}, С.В. КАМЗОЛОВА¹, Т.В. ФИНОГЕНОВА¹,
А.П. СОКОЛОВ¹, С.П. КУЗНЕЦОВ¹, Н.И. ФЕДОТЧЕВА²,
М.В. ЗАХАРЧЕНКО², М.Н. КОНДРАШОВА²

¹ *Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН,*

² *Институт теоретической биофизики РАН, Пущино*

Глиоксилатный цикл (ГЛЦ) — это другой, менее известный, чем классический цикл Кребса, путь окисления ацетил-КоА в клетках. Он функционирует при мощном поступлении ацетил-КоА, связанном с окислением жира. Создаваемые при этом высокие концентрации ацетил-КоА тормозят окисление пировиноградной кислоты и затрудняют поддержание цикла Кребса. Однако при этом легко идут основные реакции ГЛЦ: распад изоцитрата на янтарную и глиоксилевую кислоты (с последующим образованием яблочной кислоты). Эти реакции восполняют (шунтируют) ослабление цикла Кребса.

Для медицинской биохимии особенно важно, что шунтируется особенно уязвимое место — этап окисления α -кетоглутарата. Фермент α -кетоглутаратдегидрогеназа является узким местом цикла Кребса и в норме. Современными исследованиями митохондриальных болезней показано, что катастрофическое падение активности α -кетоглутаратдегидрогеназы характерно для многих видов патологии. В этих условиях поддержание активности ГЛЦ представляется надежной естественной защитой организма. Защитная, адаптивная роль ГЛЦ четко выявлена при такой универсальной модели патологии, как старение дрожжей, связанное с прогрессирующей инактивацией α -кетоглутаратдегидрогеназы [1].

К сожалению, компенсаторное значение ГЛЦ при развитии заболеваний совершенно не учитывается медицинской биохимией. Это обусловлено традиционным представлением, что ГЛЦ характерен для микрооргани-

мов и высших растений, но не реализуется у животных и человека. Одним из авторов настоящей работы было высказано предположение, что причиной, по которой в тканях животных не обнаруживается ГЛЦ, является то, что животные исследуются в состоянии покоя или подавления окислительного обмена жировой диетой [2]. Мобилизация же липидов происходит при интенсивной деятельности или развитии патологии. Действительно, позже появились сообщения об обнаружении ключевых ферментов ГЛЦ у высших животных при экстремальных или патологических состояниях [3–6]. Нами, в частности, показано наличие ключевых ферментов ГЛЦ у новорожденных крысят первых дней жизни, характеризующихся сильным преобладанием катехоламинергической регуляции [7]. Это состояние можно рассматривать как острый стресс взрослого животного. Продолжая работы по выявлению ГЛЦ в тканях животных при активирующих и патогенных воздействиях, мы провели в настоящей работе исследование ключевых ферментов ГЛЦ при иммобилизационном стрессе, который является общей моделью развития патологического процесса. Исследованы изоцитратлиаза (ИЛ) и малатсинтаза (МС). Изучены также активности ферментов, общих для ГЛЦ и цикла Кребса — цитратсинтазы и аконитазы, а также ключевых ферментов пентозофосфатного шунта.

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180–200 г. Стресс моделировали путем иммобилизации животных за конечности и резцы в положении на спине в течение 24 ч. Затем проводили эвтаназию животных углекислым газом и декапитацию. Для приготовления бесклеточного экстракта извлеченные органы гомогенизировали в 50 мМ трис-НСl буфере, рН 7,5, содержащем 1 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭДТА, 0,1% Тритон X-100 и 0,1 мМ ингибитора протеаз фенолметил-

* Автор для переписки:

© 2006 г. Моргунов И.Г.

142290 Пущино Московской обл.

Факс: (495) 956-33-70

E-mail: morgunovs@rambler.ru

сульфанилфторида. Полученный гомогенат центрифугировали при 10 000 g в течение 30 мин и в супернатанте определяли активности ферментов.

Активности цитратсинтазы (КФ 4.1.3.7) [8], аконитатгидратаза (КФ 4.2.1.3) [9], изоцитратлиазы (КФ 4.1.3.1) [10], малатсинтазы (КФ 4.1.3.2) [11], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) [12], 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.44) [13] определяли по методам, описанным ранее.

Белок определяли методом Брэфорд [14]. Активность ферментов выражали в нмоль за 1 мин на мг белка. Результаты исследований оценивали статистически.

Частично очищенный препарат изоцитратлиазы из гомогената печени получали осаждением белков сульфатом аммония в интервале концентраций 40–70% от насыщения. Полученный препарат инкубировали с 0,5 мМ изоцитрата в реакционной среде, содержащей 50 мМ трис-НСI буфер, рН 7,5, 5 мМ MgCl₂ с целью обнаружения сукцината — конечного продукта изоцитратлиазной реакции. После инкубации при 30 °С реакцию останавливали добавлением 6% HClO₄. Осажденный кислотой материал удаляли центрифугированием при 4000 g в течение 10 мин, а супернатант использовали для анализа. Образование сукцината в реакционной смеси определяли методом жидкостной хроматографии высокого давления на колонке (30×7,8 мм) Aminex HPLX-87H (Bio-Rad).

В таблице 1 представлены данные об активности ключевых ферментов глиоксилатного цикла, цикла Кребса и пентозофосфатного пути в мозгу, тимусе, печени и сердце в норме и после иммобилизационного стресса в течение

24 ч. Данные демонстрируют индукцию ферментов ГЛЦ при стрессе. Ферменты изоцитратлиаза и малатсинтаза полностью отсутствуют в тканях контрольных животных и появляются в четко определяемых количествах во всех исследованных органах при стрессе.

Видно также, что увеличиваются активности ферментов, общих для цикла Кребса и ГЛЦ — цитратсинтазы и аконитатгидратазы. Вероятно, это нарастание обусловлено именно цитозольной активностью этих ферментов, то есть их частью, относящейся к ГЛЦ, поскольку дыхание митохондрий сильно ингибировано при 24-часовом стрессе [15]. Нарастание наиболее выражено в мозгу, примерно одинаково — в тимусе и печени. Напротив, в сердце происходит снижение суммарной активности цитратсинтазы и аконитазы, которое, возможно, обусловлено известной высокой чувствительностью сердца к катехоламиновому напряжению, связанному с повреждением митохондрий.

Активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.44) — ферментов другого компенсаторного процесса — пентозофосфатного шунта также активированы при стрессе в мозгу, тимусе и печени и снижены в сердце. Одной из основных функций пентозофосфатного пути является обеспечение клеток восстановительными эквивалентами в форме NADPH, участвующего в регуляции перекисного окисления липидов и восстановлении окисленного глутатиона [16,17]. При переходе клеток к эндогенному типу питания в них могут генерироваться высокорекреационноспособные свободные радикалы, перекисные и гидроперекисные соединения [18,19]. Яв-

Таблица 1

Активность ключевых ферментов глиоксилатного цикла, цикла Кребса и пентозофосфатного пути в различных органах в норме и после иммобилизационного стресса (нмоль/мин на мг белка)

Фермент	Мозг		Тимус		Печень		Сердце	
	Норма	Стресс	Норма	Стресс	Норма	Стресс	Норма	Стресс
Изоцитратлиаза	0	19±0,68	0	18±0,70	0	21±0,65	0	11±0,67
Малатсинтаза	0	7±0,71	0	9±0,66	0	11±0,70	0	6±0,58
Цитратсинтаза	100±0,60	236±0,66	100±0,49	112±0,55	62±0,67	77±0,54	656±0,60	458±0,61
Аконитаза	26±0,71	42±0,66	22±0,58	31±0,55	41±0,40	52±0,46	240±0,51	220±0,46
Г-6-ФДГ	14±0,50	18±0,51	34±0,48	46±0,53	17±0,41	21±0,45	9±0,51	7±0,49
6-ФГДГ	11±0,61	16±0,69	31±0,56	46±0,55	27±0,66	35±0,67	13±0,61	9±0,56

Примечание: Г-6-ФДГ — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, 6-ФГДГ — 6-фосфоглюконатдегидрогеназа

ляясь сильными цитотоксинами, эти соединения, а также различные продукты перекисного окисления липидов метаболизируются с помощью глутатионовой защитной системы, функционально связанной с ферментами пентозофосфатного пути метаболизма углеводов [20, 21].

Кардинальным отличием активации ферментов ГЛЦ от ферментов других метаболических путей является то, что она реализуется на фоне нулевой активности в тканях контрольных животных. Таким образом, появление их активности свидетельствует об индукции этих ферментов в условиях стресса.

Для дальнейшего обоснования фундаментального вывода о появлении ферментов ГЛЦ в тканях животных при стрессе мы провели измерение их активностей при частичной очистке ферментов. Это отличает наши работы от других исследований ферментов ГЛЦ, проведенных на грубых экстрактах.

В этих условиях трудно получить достоверные результаты, если величины активностей малы. На активность фермента влияют многочисленные белки и метаболиты, присутствующие в бесклеточном гомогенате. Для достоверного определения наличия изоцитратлиазы в печени крысы после иммобилизационного стресса нами была проведена частичная очистка этого фермента. Для этого в гомогенат печени от животного при стрессе добавляли сульфат аммония до 40% от насыщения (242 мг/мл). Гомогенат центрифугировали и с осадком отбрасывали часть балластных белков. При этом изоцитратлиаза оставалась в супернатанте. Затем к супернатанту добавляли сульфат аммония до 70% от насыщения (236 мг/мл). При этих условиях более 90% активности изоцитратлиазы после центрифугирования обнаруживалось в осадке. С супернатантом удалялись низкомолекулярные вещества, присутствующие в гомогенате. Осадок растворяли в 100 мМ трис-НСl буфере, рН 7,5, содержащем 1 мМ MgCl₂ и 1 мМ ЭДТА. В полученном препарате активность изоцитратлиазы увеличивалась в два раза по сравнению с исходным гомогенатом и составляла 40 нмоль/мин на мг белка.

Наконец, появление активности ферментов ГЛЦ наблюдали третьим методом по определению продуктов реакции изоцитратлиазы. Частично очищенный препарат (50 мкл) изоцитратлиазы из ткани печени при стрессе инкубировали в течение 30 мин. при 30 °С в реакционной смеси (1 мл), содержащей 50 мМ трис-НСl буфер, рН 7,5, 5 мМ MgCl₂ и 0,5 мМ изоцитрата. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 6% HClO₄. В контрольную пробу кислоту добавляли сразу после перемешивания реакционной смеси. Образование продукта изоцитрат-

лиазной реакции — сукцината — определяли методом хроматографии высокого давления. Для этого 20 мкл реакционной смеси после центрифугирования (4000 g, 10 мин) наносили на колонку (30×7.8 мм) Aminex HPLX-87H (Bio-Rad), предварительно откалиброванную со стандартным раствором сукцината.

Как видно на рисунке 1, в среде без инкубации сукцинат отсутствовал. После 30 мин. инкубации в реакционной смеси наблюдалось уменьшение уровня изоцитрата и появлялся сукцинат. Таким образом, третьим методом показана индукция изоцитратлиазы при стрессе.

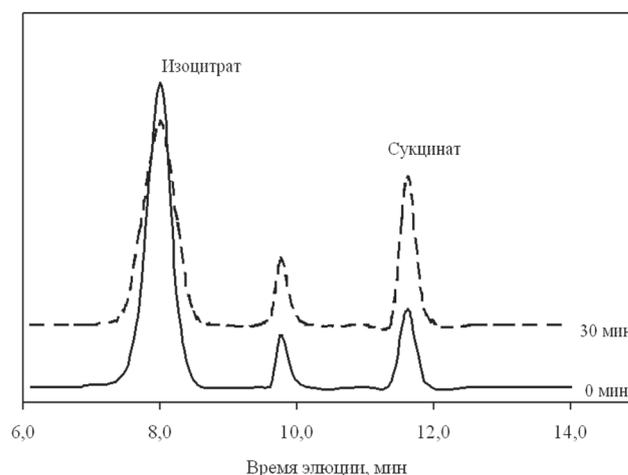


Рис. 1. Анализ субстрата и продукта изоцитратлиазной реакции методом хроматографии высокого давления

Известно, что иммобилизационный стресс связан с активацией распада липидов в организме. Это, в частности, наглядно видно по появлению эмульсии липидных капель в гомогенатах тканей [15]. При β -окислении жирных кислот происходит интенсивное образование ацетил-КоА, что соответствует условиям появления ГЛЦ у растений и микроорганизмов.

Полученные в настоящей работе, а также в нашем предшествующем исследовании данные свидетельствуют о том, что при активной мобилизации липидов в организме животных может происходить индукция ГЛЦ. Такие состояния связаны с угнетением цикла Кребса. ГЛЦ компенсирует эти нарушения, шунтируя особенно уязвимое звено окисления α -кетоглутарата. Образующиеся сукцинат и малат могут окисляться через цикл трикарбоновых кислот до оксалоацетата или использоваться в реакциях глюконеогенеза [22].

Следовательно, функционирование глиоксилатного цикла при стрессовых или патологических состояниях может обеспечивать утилизацию жирных кислот и способствовать поддержанию энергетического баланса

клеток и достаточного уровня углеводов в них. Выявление индукции ферментов ГЛЦ при патогенном воздействии позволяет предположить эффективность коррекции патологических состояний субстратом ГЛЦ — изолимонной кислотой.

Работа была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 02-04-48945) и грантом Президента Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ: НШ-824.2003.4.

Литература

1. Samokhvalov V., Ignatov V., Kondrashova M. // *Biochimie*. — 2004. — Vol. 86. — P. 39–46.
2. Кондрашова М.Н., Родионова М.А. // *ДАН СССР*. — 1971. — Т. 196(5). — С. 1225–1227.
3. Davis W.L., Jones R.G., Matthews G.L., Farmer G.R., Dickerson T., Cortinas E., Goodman D.B.P. // *Anat. Rec.* — 1990. — Vol. 227. — P. 271–284.
4. Davis W.L., Goodman D.B.P. // *Anat. Rec.* — 1992. — Vol. 234. — P. 461–468.
5. Попов В.Н., Игамбердиев А.У., Schnarrenberger C., Volvenkin S.V. // *FEBS Lett.* — 1996. — Vol. 390. — P. 258–260.
6. Епринцев А.Т., Семенова Е.В., Попов В.Н. // *Биохимия*. — 2002. — Т. 67(7). — С. 959–966.
7. Morgunov I.G., Kondrashova M.N., Kamzolova S.V., Sokolov A.P., Fedotcheva N.I., Finogenova T.V. // *Med. Sci. Monit.* — 2005. — Vol. 11(2).
8. Srere P.A. / In: *Methods Enzymol.* Ed. Lowenstein J.M. — N.Y. — Ln., 1969. — Vol. 13. — P. 3–11.
9. Anfinsen C.B. / In: *Methods Enzymol.* (Colowick S.P. and Kaplan N.O., ed.). — N.Y. — Ln., 1955. — Vol. 1. — P. 695–698.
10. Dixon G.H., Kornberg H.L. // *Biochem. J.* — 1959. — Vol. 72(3).
11. Hock, B. and Beevers H. // *Z. Pflanzenphysiol.* — 1966. — Vol. 55. — P. 405–414.
12. Kornberg H.L., Horecher B.L. / In: *Methods Enzymol.* (Ed. Colowick S.P., Kaplan N.O.). — N.Y.: Academic Press, 1955. — Vol. 1. — P. 323–327.
13. Glock G.B., Mc Lean P. // *Biochem. J.* — 1953. — Vol. 55(3). — P. 400–408.
14. Bradford M.M. // *Analyt. Biochem.* — 1976. — Vol. 72. — P. 248–254.
15. Кондрашова М.Н., Григоренко Е.В. // — *Ж. общ. биол.* — 1984. — Т. 46. — С. 516–526.
16. Горбач Э.В. // *Усп. соврем. биол.* — 1988. — Т. 105. — С. 35–49.
17. Bautista J.M., Smith M.A., Perry G. // *Arch. Biochim. Biophys.* — 1999. — Vol. 370. — P. 236–240.
18. Feher J., Csomos G., Vereckei A. *Free radical reactions in medicine.* — Berlin, Springer-Verlag, 1987.
19. Forman H.J., Boveris A. *Superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria.* — New York, Acad. Press, 1985. — P. 65–90.
20. Hothersall J., Elhassan A., Meister A. // *Enzymes.* — 1981. — Vol. 26. — P. 271–276.
21. Керимов Б.Ф. // *Вопр. мед. химии.* — 2002. — Т. 48(5). — С. 490–496.
22. Лебкова Н.П. // *Арх. патол.* — 1982. — Т. 6. — С. 68–73.

СОСТОЯНИЕ КОЛЛЕКЦИЙ МИКРООРГАНИЗМОВ В РОССИИ

С.М. ОЗЕРСКАЯ*, Г.А. КОЧКИНА, Н.Е. ИВАНУШКИНА, К.М. ЗАПРОМЕТОВА,
С.С. ЕРЕМИНА, Е.В. КНЯЗЕВА

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
Всероссийская коллекция микроорганизмов, Пущино*

В течение последних 20 лет во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ РАН под руководством Л.В. Калакуцкого ведутся сбор информации и создание распределенных баз данных о коллекциях непатогенных микроорганизмов. Вначале это были микробные коллекции Советского Союза и стран-членов СЭВ, затем коллекции микроорганизмов России. Работы проводились в соответствии с программами — КП НТП СЭВ (1986—1990), ФЦ КНТП «Экологическая безопасность России» (1993—1995), ГНТП России «Средства обеспечения исследований по физико-химической биологии и биотехнологии» (1993—1995), ГНТП «Биологическое разнообразие» (1993—2002).

Итогом этой деятельности на первом этапе была публикация сводного указателя видов микроорганизмов, поддерживаемых в 37 разных коллекциях, включая коллекции различных республик СССР и некоторых других стран [1]. Необходимо подчеркнуть, что подготовка такого издания была осуществлена задолго до начала создания зарубежных центров биологических ресурсов и организации их сетевого взаимодействия. Перечень участников этого проекта представлен в таблице 1.

Некоторые коллекции, с которыми Всероссийская коллекция микроорганизмов была тесно связана раньше, в настоящее время являются членами Всемирной федерации коллекций культур; болгарская коллекция микроорганизмов вошла в Европейскую сеть БРЦ, а чешская — в ассоциацию САВРИ. В настоящее время членами WFCC являются 12 российских коллекций, что составляет менее 3% от общего числа зарегистрированных. Их

перечень приведен в таблице 2. Курсивом обозначены коллекции, которые в настоящее время прекратили свое существование, но продолжают числиться в WFCC как действующие. Что касается российских участников данных программ, то их число практически не менялось за все последнее время. При выполнении проекта по изучению и сохранению биологического разнообразия сотрудниками ВКМ совместно с другими участниками данной программы был выпущен сводный электронный каталог непатогенных культур 17 коллекций России (рис. 1) [4]. К сожалению, после 2002 года совместные работы в этом направлении были прекращены, и какая-либо координация их деятельности уже не осуществлялась.

В 2003 году в соответствии с поручением Министерства промышленности, науки и технологий РФ была проведена работа по инвентаризации коллекций генетических ресурсов России, анализу сложившейся практики их функционирования и нормативно-правового регулирования деятельности. Основанием для выполнения работы стало решение Межведомственной комиссии по биотехнологии. Была составлена анкета, которая дала возможность участникам опроса оценить состояние и перспективы развития коллекций, исходя из собственного опыта и положения дел в организации, а также высказать свои пожелания, касающиеся оптимизации коллекционной деятельности.

Анкеты для заполнения рассылались в организации различных ведомств на всей территории РФ (табл. 3). Насколько нам известно, результаты анкетирования являются первым случаем получения межведомственных статистических данных, добытых путем прямого опроса организаций и лиц, задействованных в сфере коллекционирования микроорганизмов к 2003 году. Отклик на разосланную анкету был получен из 96 исключительно бюджетных организаций, большая часть которых подтвердила наличие в своем составе коллекций микроорганизмов, и представлен на рисунке 4.

* Автор для переписки:

© 2006 г. Озерская Светлана Михайловна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
ВКМ ИБФМ РАН, куратор коллекции грибов
Тел.: (495) 951-30-87
E-mail: smo@dol.ru

Таблица 1

Коллекции, объединенные Сводным указателем 1990 года, и их участие в современных международных объединениях

Страны	Название коллекции	Акроним	Участие в международных ассоциациях коллекций		
			WFCC*	CABRI**	EBRCN***
Азербайджан	Сектор микробиологии АН АзССР	СМБ			
Армения	Ереванский зоотехническо-ветеринарный институт	ЕрЗВИ			
	Институт микробиологии	АНМИА	803		
Белоруссия	Институт микробиологии	БИМ			
Болгария	National Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures	NBIMCC	135		+
Вьетнам	Central Institute of Scientific and Technical Information	CINTI			
Германия	National Sammlung von Microorganismen Zentralinstitut fuer Microbiologie und experimentelle Therapie der ADW der DDR	ИМЕТ			
Грузия	Институт биохимии растений	ИБРГ			
Казахстан	Институт микробиологии и вирусологии	ИМ _и В			
Латвия	Институт микробиологии АН ЛатвССР	ИМЛ			
Литва	Институт ботаники АН Литвы	ИБЛ			
Монголия	The Centre of Scientific and Technical Information	CNTI			
Россия	ВКМ, ВКПМ, ВНИИПМ, Гипро-рыбфлот, ИНА, ВИЗР, ВНИИСХМ, КММ, БИН, ИБФРМ, ВНИКМИ, ИЭГМ, МГУ ФП, МГУ БИО, ВНИИА, ИНМИ, ИФР		Да		
Узбекистан	Институт микробиологии АН УзССР	КМУ _{зб}	860		
Украина	Институт ботаники	ИБК			
	Институт микробиологии и вирусологии	ИМВ			
	Киевский государственный университет	КГУ			
	Институт проблем криобиологии и криомедицины	ИПК _и К			
Чехия	Czechoslovak Collection of Microorganisms	ССМ	65	+	
Эстония	Тартуский государственный университет	ТГУ			
	Институт зоологии и ботаники АН ЭССР	ТАА	821		

Примечания:

* Всемирная федерация коллекций культур [2].

** Объединение европейских коллекций с целью обеспечения доступа к биоресурсам и информации.

*** Европейская сеть биологических ресурсных центров [3]

Российские коллекции микроорганизмов, зарегистрированные в WFCC

№№ п/п	Акроним	№№ в WDCM*	Название коллекции
1	RIA	WDCM337	The Russia Research Institute for Antibiotics Culture Collection
2	VKM	WDCM342	All-Russian Collection of Microorganisms
3	CALU	WDCM461	Collection of Algae in St. Petersburg State University
4	LTI	WDCM554	Cryobank of Microorganisms-Destructors
5	VKPM	WDCM588	Russian National Collection of Industrial Microorganisms
6	IPPAS	WDCM596	Culture Collection of Microalgae IPPAS
7	BOROK	WDCM602	The Collection of Algae
8	PGC	WDCM641	Peterhof Genetic Collection of Microalgae
9	KMM	WDCM644	Collection of Marine Microorganisms
10	VIZR	WDCM760	Collection for Plant Protection, All-Russian Institute of Plant Protection
11	IEGM	WDCM768	Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms
12	CCIBSO	WDCM836	Culture Collection IBSO

Примечание: *Всемирный центр данных по микроорганизмам

Результаты анкетирования российских научно-исследовательских организаций (2003 г.)

Ведомство	Разослано запросов	Получено ответов	
		Всего	О наличии коллекций
МГУ им. М.В. Ломоносова	18	9	9
Министерство здравоохранения РФ	104	29	30
Министерство образования РФ	81	5	4
Министерство по чрезвычайным ситуациям РФ	1	1	0
Министерство промышленности, науки и технологий РФ	7	3	4
Министерство сельского хозяйства и продовольствия РФ	2	2	2
РАМН	30	7	13
РАН	109	19	22
РАСХН	98	21	20
Негосударственные учреждения	4	0	0
ИТОГО	454	96	104

По результатам анкетирования в Российской Федерации зафиксировано наличие 104 коллекций, часть из которых находится в одном учреждении или даже в одной лаборатории.

Распределение по стране микробных коллекций довольно неравномерно. Их большая часть находится в Москве и Санкт-Петербурге, однако и в других городах имеются довольно значительные и разнообразные фонды (рис. 2).

1. ВКМ, ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН, Пушкино
2. БИН им. В.Л.Комарова РАН, Санкт-Петербург
3. ИБМ ДВО РАН, Владивосток
4. ИБК РАН, Пушкино
5. ИФРим. К.А.Тимирязева РАН, Москва
6. ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток
7. ВИЗР РАСХН, Санкт-Петербург
8. ВНИПАКК РАСХН, Санкт-Петербург
9. ВНИИСХМ РАСХН, Санкт-Петербург
10. Факультет почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
11. Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва
12. БиНИИ С-ПБУ, Санкт-Петербург
13. ИБ УНЦ РАН, Уфа
14. ИБСО СО РАН, Красноярск
15. ИМГ РАН, Москва
16. ИЭГМ УрО РАН, Пермь
17. НИИ «Микроб» МЗ РФ, Саратов

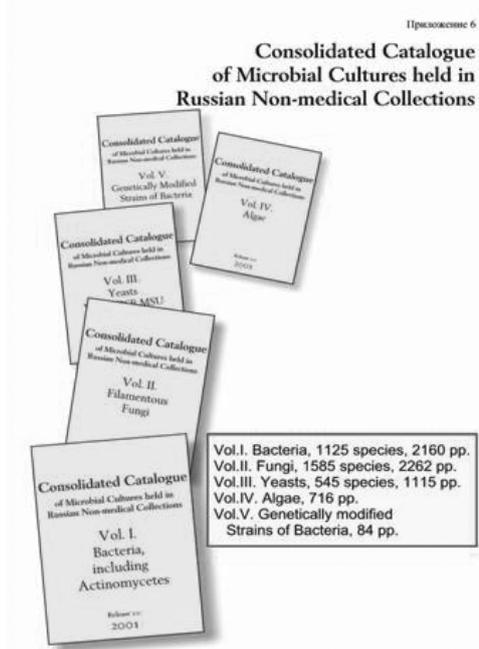


Рис. 1. Организации, участвовавшие в создании «Объединенного каталога российских коллекций» (1999–2002 гг.)

Формирование микробных коллекций в России началось в 30-е годы прошлого века (рис. 3), а пик их организации приходится на 50–60-е годы, когда были образованы в общей сложности 36 коллекций. Новая волна учреждения коллекций микроорганизмов началась в 90-е годы и продолжается до настоящего времени.

На вопрос о том, кому принадлежит коллекция, получены самые разнообразные ответы – 8 кураторов считают собственниками себя лично, 41 – лабораторию, 73 – институт и 13 – ведомство. Только две коллекции определяют свои фонды либо как «принадлежащие государству» – ВКПМ, либо как «федеральную собственность в управлении РАН» – ВКМ.

Распределение числа коллекций по ведомствам представлено на рисунке 4.

Наибольшее количество штаммов зафиксировано в объединенном фонде МЗ РФ, однако их оформление в виде каталогов проведено лишь для 30% фонда. Обеспечение различных учреждений компьютерной техникой в настоящее время находится на относительно высоком уровне – 3/4 коллекций поддерживают информацию о коллекционных фондах в электронном виде. Тем не менее за последние 15 лет были изданы (в печатном или электронном виде) каталоги только 27 коллекций из 104. Для сравнения можно сказать, что 9 коллекций САВРИ за последние годы выпустили 28 каталогов [5].

Таблица 4

Категоризация российских коллекций по объемам поддерживаемого фонда

Наличие каталога	Число коллекций, в которых количество штаммов составляет				
	менее 100	100–1000	1001–7000	Более 7000	Нет данных
Есть	2	11	11	4	1
Нет	18	38	12	1	-
Нет данных	-	1	1		4



Рис. 2. Микробные коллекции России

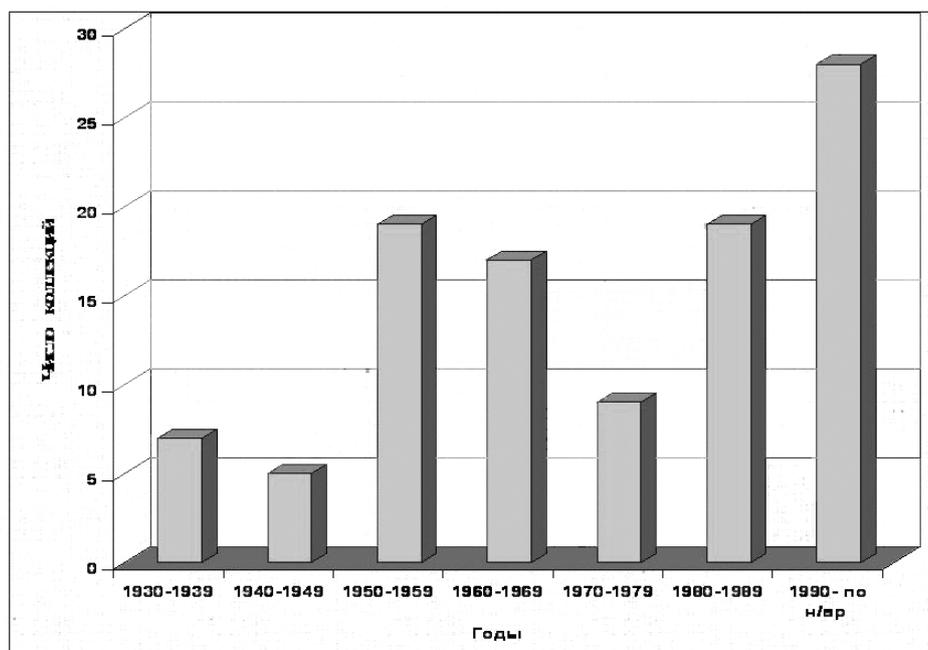


Рис. 3. Формирование микробных коллекций России

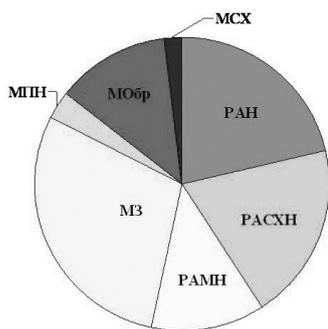


Рис. 4. Распределение российских коллекций по ведомствам

В таблице 4 представлены категории, на которые можно разделить все российские коллекции.

Как видно из таблицы 4, к 1-й категории (более 7000 штаммов при наличии каталога) относятся всего 4 коллекции. Эти коллекции – ВКМ РАН, ВКПМ МП РФ, коллекция Института «Микроб» и Музей живых культур Ростовского НИПЧИ МЗ РФ. Все они функционируют более 40 лет и хорошо известны в России и за рубежом. В целом в их фондах хранятся около 45000 штаммов микроорганизмов, что составляет более 1/3 от совокупного числа сохраняемых коллекций культур.

Ко второй категории относятся 11 коллекций, имеющих каталоги и поддерживающих от 1001 до 7000 культур. Они принадлежат к шести различным ведомствам и поддерживают совокупно около 30000 штаммов. Широко известные коллекции в этой категории – это коллекции ВНИИСХМ, ВИЗРа, а также коллекция базидиальных грибов Ботанического института РАН.

Коллекции первых двух категорий могут рассматриваться в качестве возможной основы для организации в России центров биологических ресурсов.

Какое количество штаммов поддерживается всеми коллекциями в целом, оценить довольно трудно, поскольку не все коллекции приводят точные данные. Однако их приблизительное общее число составляет более 100000 штаммов.

Дублирование коллекций по поддержанию примерно одинаковых специализированных фондов возможно, хотя по результатам данного анкетирования говорить об этом трудно. Для примера приводим сведения, полученные нами в процессе подготовки объединенного каталога 2002 года (рис. 5). Показано, что видовая специфичность некоторых коллекций достигает практически 100%, что говорит о безусловной значимости поддерживаемых фондов для сохранения биологического разнообразия. В любом случае дублирование по штаммам маловероятно, поскольку основная масса коллекций пополняет фонды за счет собственных работ по выделению их из природных источников.

Далее проведем сравнение системы коллекций России по показателям, которые обычно используются для оценок их деятельности, с аналогичными сведениями, полученными при анкетировании коллекций Европейской сети биологических ресурсных центров – БРЦ [6]. Известно, что организации подобных центров за рубежом в последние годы уделяется большое внимание. В настоящее время существуют две крупные ассоциации европейских БРЦ – SABRI и EBRCN, которые уже упоминались выше. Перечень коллекций микроорганизмов – участниц этих структур приведен в таблице 5.

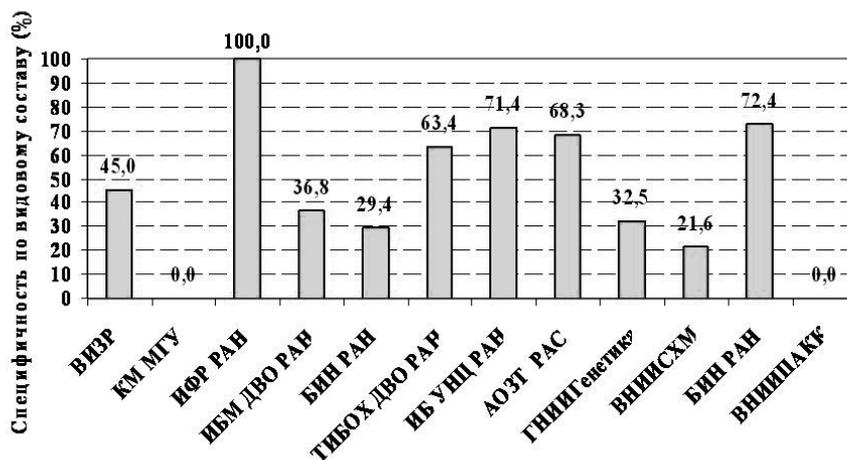


Рис. 5. Уникальность фондов российских коллекций

Коллекции, входящие в состав международных биологических ресурсных центров

Страна	Организация	Акроним коллекции	Член БРЦ	
			CABRI	EBRCN
Великобритания	CABI Bioscience	CABI	+	+
	European Collection of Cell Cultures	ECACC	+	
	National Collections of Industrial, Marine and Food Bacteria	NCIMB	+	
Бельгия	Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms	BCCM/IHEM BCCM/LMBP BCCM/LMG BCCM/MUCL	+	+
Нидерланды	Centraalbureau voor Schimmelcultures	CBS	+	+
Франция	Institut Pasteur	CIP	+	+
	Centre National EINS France	CERDIC	+	
Германия	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	DSMZ	+	+
Италия	National Institute for Cancer Research Interlab Cell Line Collection	ICLC	+	+
Болгария	National Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures	NBIMCC		+
Венгрия	National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms	NCAIM		+
Латвия	Microbial Strain Collection of Latvia	MSCL		+
Польша	Institute of Agriculture and Food Biotechnology Collection of Industrial Microorganisms	CIM IAFB		
Чехия	Czech National Collection of Type Cultures	CNCTC		+

Поскольку CABRI была сформирована раньше, предполагается, что методология коллекционного дела должна быть основана на разработках, представленных в виде серии руководств на сайте CABRI, доступном и для наших пользователей — www.cabri.org.

Сравнение разнообразия групп микроорганизмов, поддерживаемых в различных коллекциях Российской Федерации и европейских БРЦ представлено в таблице 6.

Суммарный состав фондов России охватывает практически все известные группы микроорганизмов — бактерии (включая археи), грибы (включая дрожжи), микроскопические водоросли, простейшие, вирусы (включая фаги). Западные коллекции более активно развивают поддержание коллекций генов и генетических конструкций.

Методы поддержания штаммов (табл. 7) в коллекциях довольно разнообразны.

По данным анкетирования видно, что основным, если не единственным, методом хранения поддерживаемых культур микроорганизмов в российских коллекциях все еще остается метод периодических пересевов и другие традиционные методы хранения. Это связано с простотой исполнения и дешевизной используемых методов, хотя они и не обеспечивают стабильное сохранение свойств организма. Аналогичные данные для Европейской сети коллекций культур представлены значительно более высокими показателями для криоконсервации и лиофилизации.

Наиболее употребительными методами характеристики поддерживаемых культур (табл. 8) продолжают оставаться культурально-микроскопические и физиологические.

Таблица 6
Объекты хранения российских
и зарубежных коллекций

Сохраняемые объекты	Число коллекций / Число единиц хранения	
	Российские коллекции	Европейские БРЦ
Бактерии	66 / 83846	10 / 63251
Археи	1 / 53	1 / 400
Мицелиальные грибы	44 / 14520	10 / 80351
Дрожжи	29 / 9705	
Вирусы	22 / 17312	3 / 793
Фаги	4 / 1119	1 / 129
Гибридомы	1 / 186	2 / 86
Водоросли	4 / 779	
Плазмиды	1 / 15	5 / 6213
Прионы	1 / 8	
Протозоа	2 / 2016	
Нематоды	1 / 31	1 / 200
Гибриды или мутанты		2 / 6213
Плазмидная ДНК		1 / 2600
Библиотека ДНК		2 / 22

Таблица 7
Методы поддержания штаммов в коллекциях
(процент от числа ответивших на вопрос)

Методы хранения	Российские коллекции	Европейские БРЦ
Периодические пересевы	88	30
Хранение под минеральным маслом	44	30
Хранение в почве	9	10
Хранение под водой	14	
Хранение на инертных носителях	7	10
Криоконсервация	32	100
Лиофилизация	47	70

Таблица 8
Методы характеристики культур
(процент от числа коллекций)

Методы	Россия	EBRCN
Культурально-морфологические и физиологические	92	75
Хемотаксономические	35	71
Серологические	42	нет данных
Молекулярно-биологические	50	79

Молекулярно-биологические методы используются в 52 коллекциях Российской Федерации. Далее в порядке убывания следуют серологические и хемотаксономические методы, что заметно отличает российские коллекции от уровня западных. Использование современных методов характеристики культур обычно коррелирует с объемами коллекций, их направленностью, ведомственной принадлежностью и, как следствие, технической и научной оснащенностью.

Однако наличия дорогостоящей приборной базы совершенно недостаточно для того, чтобы качественно охарактеризовать коллекцию. Необходима всесторонняя паспортизация культур, включая и такие показатели, как, например, географическая и субстратная специфика штаммов. В недавно опубликованной работе специалистов АГСС [7] показано, что такие данные позволяют выявить наименее изученные места обитания микроорганизмов.

Важными показателями являются и данные о тех или иных свойствах культур, которые могут быть получены из анализа публикаций о коллекционных штаммах. Подобный справочник был опубликован несколько лет назад по штаммам ВКМ [8]. Предсказать же заранее, как будет использован тот или иной штамм, невозможно, поскольку этот вопрос находится целиком в руках конкретных исследователей.

Как видно из рисунка 6, из 104 коллекций только 7% не выдают культуры из своих фондов, а 11% коллекций предоставляют культуры в любые российские и зарубежные организации. В эту группу вошли и 3 наиболее крупные коллекции, отнесенные нами к 1-й категории. Основная масса коллекций выдает культуры частично в те или иные учреждения согласно их профилю.

Число сотрудников в среднем на одну коллекцию показано в таблице 9.

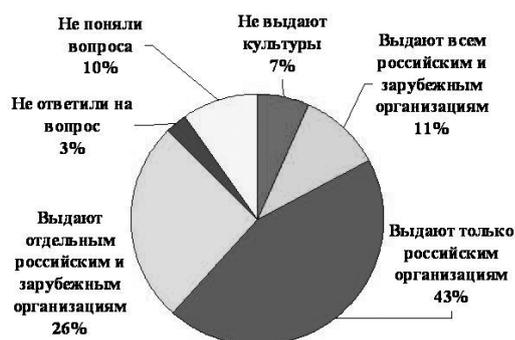


Рис. 6. Доступ к коллекционным фондам

Из приведенных данных видно, что число научных сотрудников, непосредственно занятых в работе с коллекционными фондами, практически одинаково, тогда как технического персонала в западных коллекциях почти в два раза больше, чем в российских. Это усредненные данные. Большая часть российских коллекций поддерживается малыми силами: половина имеет штат от 1 до 10 сотрудников, 17 коллекций не имеют специального штата совсем. Единичные коллекции выделяются более значительной штатной численностью сотрудников (от 11 до 40).

Таблица 9
Штат сотрудников коллекций
(среднее число на одну коллекцию)

Штат	Россия	ЕВРСН
Научные сотрудники	4,1	3,9
Технический персонал	3,6	6,3

Наличие бюджетного финансирования отметила только половина коллекций России и все БРЦ Европейской сети (табл. 10). О наличии еще каких-либо дополнительных средств финансирования сообщили соответственно 15% российских и 80% западных коллекций. Как известно, дополнительные — хотя и скромные — средства могут быть получены коллекциями за выдачу реплик поддерживаемых культур (табл. 11), идентификацию штаммов и составление паспортов на культуры заказчика, за конфиденциальное хранение и другие услуги.

Дополнительное финансирование в виде грантов сотрудников и их участия в целевых программах имеется лишь в 23% коллекциях.

Таблица 10

Финансирование коллекций
(процент от числа ответивших)

Источник финансирования	Россия	ЕВРСН
Бюджетные средства	54	100
Грантовая поддержка	23	нет данных
Собственный заработок	15	80
Другое	8	

В то же время ряд коллекций активно участвует в совместных разработках как внутри своих учреждений, так и со сторонними организациями. 38 коллекций предоставляют инокульты для производственных наработок.

Судя по результатам анкетирования, плата за культуры устанавливается довольно произвольно и различается в широких пределах для различных коллекций. При этом большая часть коллекций не взимает плату за выдачу штаммов, выдаваемых для учебных целей, при выполнении совместных исследований, при выдаче культуры внутри института, при обмене культурами, а также при выдаче культуры депозитору.

Здесь необходимо особо отметить, что принцип непрерывной долговременной деятельности коллекций предусматривает существование долгосрочных финансовых обязательств со стороны организации-учредителя. Поддержка исключительно в форме краткосрочных контрактов недопустима для коллекций, целью которых является обеспечение длительного хранения и снабжения культурами заинтересованных организаций.

Таблица 11
Выдача штаммов
(процент от числа ответивших)

Условия выдачи	Россия	ЕВРСН
<u>Бесплатно</u>	70	100
в том числе:		
совместные исследования	63	90
учебные цели	67	10
депозитору	3	40
обмен	58	100
<u>За плату</u>	26	100

Косвенными критериями профессиональной специализации коллекций могут быть такие показатели,

Таблица 12

Нормативные документы, используемые коллекциями культур

№ п/п	Название документа	Сколькими коллекциями используется документ		
		При категоризации по группам патогенности	При выдаче штаммов	При получении штаммов
1	Guidelines for the Establishment and Operation of Collections of Cultures of Microorganisms, WFCC, 2 th ed., 1999. 24 p.	-	3	3
2	Инструкция о порядке хранения, обращения, отпуска, а также вывоза и ввоза в СССР из зарубежных стран культур микроорганизмов, токсинов и ядов животного и растительного происхождения. Утв. ГУВ МСХ СССР 10.01.74. М., 1974, 25 с.	-	1	1
3	Объекты биологии и биотехнологии. Методические рекомендации по правовой охране. М.: ВНИИПИ, 1990 г., 324 с.	1	1	1
4	Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности. СП 1.2.011-94. М.: Госкомсанэпиднадзор России, 1994, 151 с.	19	16	16
5	Санитарные правила. Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и гельминтами. СП 1.2.731-99. М.: Госкомсанэпиднадзор России, 1999, 108 с.	13	12	12
6	Санитарные правила. Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности. СП 1.2.036-95. ГКСЭН России, Москва, 1996, 80 с.	22	25	24
7	Proposal for a Council Directive ... 90/679/EEC..	2	-	-

как совмещение деятельности, существование в виде отдельного подразделения и наличие положения о коллекции. Из ответов вытекает, что сотрудники большей части коллекций (94 из 104) вынуждены совмещать поддержание фондов с другими видами деятельности в своих учреждениях и лабораториях. Коллекции как отдельные профилированные подразделения существуют только в 23 случаях. Положения, утвержденные на уровне ведомства, имеются только для 8 коллекций.

Нормативные документы, используемые обычно в работе по приобретению культур, их выдаче и категоризации по группам патогенности приведены в таблице 12. Набор документов включает также акты передачи, гигиенические сертификаты, гарантийные письма пользователей, ведомственные инструкции и др. Лишь единичные коллекции имеют представления о разработанных в известных коллекциях мира документах, публикуемых, в частности, WFCC и европейской сети БРЦ [9–12].

Несмотря на имеющиеся трудности абсолютное большинство коллекций (99 из 104) планирует поддерживать свои фонды и дальше, в течение длительного времени. Однако кураторы коллекций утверждают, что без финансовой помощи продолжение поддержания фондов не представляется возможным. Одним из вариантов их сохранения предлагается передача их в другие, в том числе и зарубежные коллекции.

В связи с этим остается надеяться, что дело с микробными коллекциями России сдвинется с места. Недавно на съезде биотехнологов РФ был принят проект Национальной программы по развитию биотехнологии, где в качестве приоритета указана необходимость поддержания коллекций микроорганизмов. Результаты нашего исследования показали, что в РФ несмотря ни на что все еще существуют коллекции микроорганизмов, которые способны выполнять функции центров биоресурсов во всем их многообразии и стать основой их формирования.

Литература

1. Виды мицелиальных и дрожжевых грибов, поддерживаемых в коллекциях Болгарии, Вьетнама, Монголии, СССР, Чехословакии // Биотехнология, биотехника, biotechnology. Болгария. – 1990. – № 5–6.
2. WFCC. <http://www.wfcc.info/>
3. EBRCN. <http://www.ebrcn.org/docs.php/>
4. Сводный электронный каталог культур 17 коллекций России – <http://www.vkm.ru/>, <http://www.sevin.ru/>
5. CABRI. *Common Access to Biological Resources and Information*. <http://www.cabri.org/>
6. *Enquiry on European Biological Resources Centres. Results*. <http://www.ebrcn.org/page.php?ID=WP3%20Enquiry>
7. Floyd M.M., Tang J., Kane M., Emerson D. Captured diversity in a culture collection: Case study of the geographic and habitat distributions of environmental isolates held at the American Type Culture Collection // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – P. 2813–2823.
8. *Использование коллекционных культур ВКМ в работах отечественных исследователей. Библиографический указатель 1980–1988*. Пущино, 1989. Составитель – Григорян Д.И. Ответственный редактор Калакуцкий Л.В. – Изд-во Научный центр биологических исследований АН СССР в Пущино, 1989. – 254 с.
9. *Classification of biological agents, European Community. Directive 2000/54/EC*. www.bccm.belspo.be/about/mucl_directive_200054EC.pdf
10. *Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms*, <http://wdcm.nig.ac.jp/>.
11. *Guidance for the operation of biological research centers (BRCs). Part 1: General requirements for all BRCs*. www.oecd.org/.
12. *Guidance for the operation of biological research centers (BRCs). Part 2: Micro-organisms*. www.oecd.org/.

О СОЗДАНИИ ФЕДЕРАЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ ПО НАПРАВЛЕНИЮ «МОРСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ»

Г.В. МАСЛОВА*

*Научно-исследовательский и проектно-конструкторский институт
по развитию и эксплуатации флота (ФГУП «Гипрорыбфлот»), Санкт-Петербург*

Проблема сохранения здоровья и увеличения продолжительности жизни является одной из самых важных для человека и общества. Пища здесь является базовым элементом и имеет такое же принципиальное значение для здоровья и развития человека, как чистый воздух и чистая вода.

В основе современных представлений о здоровом питании лежит концепция оптимального питания, выдвинутая академиком РАМН В.А. Тутельяном, основанная на употреблении пищи и предусматривающая обязательность полного обеспечения потребностей организма не только в энергии, эссенциальных нутриентах, макро- и микроэлементах, витаминах, но и в целом ряде необходимых минорных компонентов, например, пищевых волокнах [1].

Вместе с тем анализ современного состояния качества жизни человека показывает, что в последние десятилетия произошло повсеместное ухудшение здоровья населения России (особенно детей и подростков), а также нарастание хронических и так называемых «болезней цивилизации» (атеросклероз, диабет, сердечно-сосудистые и онкологические заболевания), что во многом объясняется как дефицитом жизненно важных нутриентов в продуктах питания, так и их нерациональным соотношением в пищевых продуктах.

По данным Минздрава России, в последние годы резко ухудшилось положение дел с организацией и состоянием питания детей в дошкольных учреждениях (яслях, садах) и школах во многих субъектах РФ.

Статистические данные свидетельствуют, что рационы питания в большинстве случаев обеспечивают потребность детского организма в белках и энергии только на 70%, а в витаминах — на 20–40%. Снабжение школьников горячим питанием сократилось до 10–30%.

Актуальной является коррекция рационов питания и других возрастных групп населения, например, пожилых людей (геродиетическое питание), а также лиц различной профессиональной занятости.

Крайне неблагоприятно обстоит дело с лечебным и лечебно-профилактическим питанием.

Состояние здоровья населения во многих регионах России, по данным Института питания РАМН, расценивается как критическое.

Такая картина характерна не только для России. Темпы роста населения в мире, которое увеличивается ежегодно на более 90 млн. человек, опережают темпы производства пищевой продукции.

Наиболее реальный выход из существующего положения — это поиск новых эффективных способов увеличения пищевых ресурсов, использование нетрадиционных видов сырья, создание безотходных технологий.

В настоящее время стало очевидно, что мировые производственные ресурсы не могут быть увеличены до необходимого объема без широкого внедрения биотехнологии, базирующейся на интегральном использовании современных достижений биологии, биохимии, органической, физической, коллоидной химии, генной инженерии, получении пищевых продуктов на основе микробиологических и ферментативных процессов.

Решение проблемы отечественные ученые и мировое научное сообщество также связывают с обеспечением населения оптимальным питанием, созданием и активным внедрением в современную структуру питания функциональных продуктов массового потребления,

* Автор для переписки:

© 2006 г. Маслова Галина Васильевна

д.т.н., главный научн. сотрудник,

зав. отделом ФГУП «Гипрорыбфлот»

190000 Санкт-Петербург, ул. Малая Морская, 18–20

Факс: (812) 314-60-36, (812) 312-04-15

E-mail: maslova36@grf.spb.ru

полезных для здоровья благодаря наличию в их составе физиологически ценных нутрицевтиков, восполняющих дефицит эссенциальных пищевых веществ и выступающих в качестве эффективного инструмента защиты организма от негативных биологических и техногенных воздействий. Регулярное потребление таких продуктов в составе пищевых рационов соответствует принципам здорового питания и существенно снижает риск возникновения различных заболеваний.

По официальным данным, мировой рынок функциональных продуктов ежегодно увеличивается на 15–20%.

В ряде европейских стран одержимость здоровым питанием, стремление к употреблению правильной пищи охватили большую часть общества и даже привели к появлению нового типа психического расстройства, получившего название нервной орторексии.

Практика ведущих развитых стран показывает, что сохранение генофонда нации обеспечивается теми государствами, в которых здоровье человека становится приоритетной стратегической задачей. Доступ к безопасному и здоровому многообразию пищевых продуктов является одним из основных прав человека.

Ряд федеральных законов, принятых в последние годы в России: «О качестве и безопасности пищевых продуктов», «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», «О защите прав потребителей», «О техническом регулировании», постановление Правительства РФ «О государственном надзоре и контроле в области обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов» № 987 от 21.12.2000 г. и др., — свидетельствует о наметившейся тенденции в политике и нашего государства в направлении повышения качества жизни за счет обеспечения населения полноценными и безопасными продуктами питания.

Объекты водного промысла как по объему добычи, так и по содержанию в них необходимых жизненно важных компонентов пищи, в том числе таких биологически активных веществ, которые присущи только водным организмам, занимают особое место в питании человека и могут во многом восполнить дефицит ингредиентов, ответственных за нарушение пищевого статуса населения России.

Значимость рыбо- и морепродуктов в обеспечении сбалансированного питания человека достаточно велика. Рыбная промышленность является поставщиком таких жизненно важных нутриентов, как животный белок, липиды, витамины, минеральные вещества, пищевые волокна.

Белки гидробионтов содержат все незаменимые аминокислоты; липиды объектов водного промысла являются единственными природными источниками эссенциальных жирных кислот — эйкозапентаеновой и докозагексаеновой; витамины А, Е, каротиноиды относятся к природным антиоксидантам, выполняющим роль ингибитора свободнорадикальных реакций. Благодаря этим уникальным свойствам гидробионты широко используются в качестве пищевых продуктов, являются основой для детского и геродиетического питания, многих лечебно-профилактических препаратов и биологически активных добавок (БАД) к пище.

Высокая пищевая и биологическая ценность объектов водного промысла создает возможность производить из них разнообразную продукцию функционального назначения: быстрозамороженные блюда, консервы, пресервы, кулинарные изделия, соленую и копченую продукцию.

При производстве широкого ассортимента здорового питания могут быть использованы как морские, так и пресноводные виды рыб, например, рыбы семейства тресковых *Gadidae* (треска, пикша, навага, путассу, минтай и др.), семейства мерлузовых *Merluccidae* (макрорус, хек серебристый, мерлузы), семейства скорпеновых *Scorpaenidae* (окунь морской золотистый, окунь морской и др.), семейства лососевых *Salmonidae* (горбуша, кета, лосось атлантический), из пресноводных — судак, сазан, лещ, щука и другие.

Рыбы семейств тресковых и мерлузовых, а также судак содержат в среднем 17,0–19,0% белка, 0,4–1,4% жира, 77,0–82,0% влаги, 0,9–1,4% золы. Они являются типичными столовыми рыбами и могут быть рекомендованы как для производства вареной, жареной, так и для запеченной продукции.

Рыбы семейств скорпеновых и лососевых, а также пресноводных отличаются повышенным содержанием жира (3,4–14,8%) и белка (19,0–21,6%) и рекомендуются для производства деликатесной продукции и продукции лечебного назначения.

Большую роль в обеспечении населения продуктами функционального питания играют беспозвоночные (ракообразные, моллюски) и водоросли, богатые белками, минеральными веществами, биологически активными компонентами.

Для производства диетического питания особого внимания заслуживают освоенные отечественным промыслом креветки, криль, мидии, кальмары.

Морепродукты отличаются приятным вкусом, богаты белками (14,0–21,5% на сухое вещество), содержат

более 30 наименований жизненно важных микроэлементов, в том числе — железо, марганец, магний, фосфор, цинк, медь, никель, хром, кобальт, алюминий. Белки морепродуктов характеризуются высоким содержанием незаменимых аминокислот. В составе незаменимых аминокислот преобладают лейцин и лизин, недостаточное количество которых отмечается в растительных белках. Поэтому многих беспозвоночных можно рассматривать как лучшую добавку к продуктам растительного происхождения.

В составе жирных кислот липидов преобладают полиненасыщенные — эйкозапентаеновая, докозагексаеновая, линоленовая и арахидоновая. Установлен лечебный эффект морепродуктов, особенно мидий, в диетическом питании.

Ценными в пищевом отношении являются и бурые водоросли, освоенные отечественным промыслом, в частности, ламинарии — *L. japonica*, *L. angustata*, *S. japonica*.

Ламинария японская — наиболее ценный промысловый вид водорослей. Количество белка в ней изменяется в пределах 2,6—17,1%, основную часть общего азота составляет белковый азот — 59,6—89,0%, небелковый азот находится в пределах 11,0—40,4%. Белки ламинарий содержат 16—17 индивидуальных аминокислот, среди которых преобладают глутаминовая и аспарагиновая. По содержанию незаменимых аминокислот белки ламинарий являются полноценными в пищевом отношении [2].

Водоросли богаты минеральными веществами и являются естественными концентраторами минеральных элементов.

Кроме основных — кальция, фосфора, магния и т.п. — в составе сухого вещества бурых водорослей обнаружены также такие редкие микроэлементы, как селен, ванадий, рубидий, кобальт, никель, молибден, кадмий, титан, йод.

Значительное содержание йода в ламинариях (более 0,2%) позволяет рекомендовать их использование при изготовлении пищевой продукции лечебно-профилактического и лечебного назначения.

Большое значение имеет микроэлемент селен, содержащийся в бурых водорослях и участвующий в процессах метаболизма, оказывая положительное влияние на усвоение йода, дефицит которого отмечается практически во всех регионах России.

Таким образом, рыба, морепродукты, водоросли являются природными источниками полного набора эссенциальных нутриентов — полноценных белков, полиненасыщенных жирных кислот, витаминов, минераль-

ных компонентов, пищевых волокон, необходимых для нормального развития и жизнедеятельности человека, способствуют профилактике и ликвидации различных нарушений в организме, обусловленных йодной недостаточностью, железодефицитной анемией, и многих других.

Применение при производстве продукции здорового питания различных видов рыб, беспозвоночных, водорослей в сочетании с овощными, крупяными, молочными ингредиентами позволит получить продукцию, сбалансированную по составу, обогащенную функциональными компонентами, продукцию, адекватную индивидуальным особенностям организма, обеспечивающую требования организации здорового питания населения России.

Использование ракообразных, моллюсков, иглокожих, водных растений уже сегодня позволило специалистам отраслевых НИИ (ВНИРО, АтлантНИРО, ТИНРО, Гипрорыбфлот и др.) и вузов получить уникальные вещества с ярко выраженной биологической и физиологической направленностью.

Так, например, разработаны белковые гидролизаты и препараты с высокими показателями биологической активности из мидий, рапаны, гонад кальмара — «МИДИВЕТ», «МИГИТ», «Мидел», «Рапанин», «Кальмарин» и другие, используемые в качестве лечебно-профилактических добавок для обогащения продуктов аминокислотами, макро- и микроэлементами.

На основе рыбьего жира с добавлением растительных масел, фитодобавок созданы БАД — «Полиен», «Полиен-фито», «Липоэл», «Гидробионол», «Код-витолен», препараты рыбьего жира с каротиноидами, фосфолипидами, сапонинами, усиливающими терапевтический эффект, и многие другие с высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот, в том числе эйкозапентаеновой и докозагексаеновой, витаминов А, Е, Д.

Значительное количество БАД создано на основе хитинсодержащего сырья (отходов от разделки краба, креветки, криля). Высокие сорбционные, бактериостатические, антиоксидантные, иммуномодулирующие свойства хитозана использованы при разработке таких препаратов, как «Хитан», «Полихит», «Фитохитодез», выпускаемые промышленным предприятием ЗАО «Биопрогресс». В Институте «Гипрорыбфлот» на основе хитина создана БАД, усиливающая обогащение и усвоение организмом кальция — «Кальций - ДЗ - Хизитэл», «Хитозанэл» и другие.

Благодаря усилиям специалистов рыбной отрасли, медиков, ученых смежных отраслей промышленности в последние годы значительно расширились знания о

морских водорослях и их целебных свойствах. Созданы и освоены промышленностью БАД на основе водорослей — «Ламиналь», «Кальцилан», «Канальгат», «Натальгин», «Маринам» и многие другие, обогащающие организм жизненно важными минеральными веществами, в том числе и такими, как железо, йод, селен, недостаточное потребление которых приводит к железодефицитной анемии, йододефицитным заболеваниям, снижению иммунитета организма.

Отраслевыми НИИ и рыбоперерабатывающими предприятиями накоплен определенный опыт по разработке и реализации продуктов здорового оптимального питания — быстрозамороженных блюд, консервов, кулинарии и т.п. Разработан ряд документов отраслевого значения по организации производства продуктов здорового питания для детского, школьного, геродиетического, лечебно-профилактического питания, потребления продуктов специального назначения. Разработана Концепция обеспечения здоровым питанием населения России на основе сырьевых ресурсов водного промысла, одобренная Научно-исследовательским институтом питания РАМН [3]. Даны предложения к проекту «Основ политики Российской Федерации в области здорового питания населения России» на период до 2010 года.

Несмотря на достигнутые определенные результаты и создание значительного ассортимента качественной продукции и биологически активных добавок к пище из гидробионтов, сложившаяся ситуация в области использования сырьевых ресурсов водного промысла остается неблагоприятной.

На заседании Морской коллегии в июне 2005 года Председатель Правительства РФ М.Е. Фрадков охарактеризовал состояние рыбной отрасли как кризисное, представляющее угрозу продовольственной безопасности страны.

Положение усугубляется тем, что начиная с 90-х годов в Российской Федерации отмечен значительный спад добычи гидробионтов, обусловленный дестабилизацией экономического положения в стране, сокращением и моральным износом рыбопромыслового флота, нарушением традиционных связей и разделом собственности между странами СНГ, рядом других причин. Являясь ведущей рыбопромысловой державой мира, занимая второе после Японии место по добыче объектов водного промысла, СССР в течение нескольких десятилетий обеспечивал стабильный улов рыбы и морепродуктов на уровне 10,0–11,0 млн. т в год. Улов же в России в 2005 г. составил около 4 млн. т, соответственно вдвое (до 10

кг) за этот период снизилось среднегодовое потребление рыбной продукции на душу населения.

В настоящее время более половины отечественных судов не возвращаются с уловом в российские порты, в результате чего рыбоперерабатывающие предприятия работают не на полную мощность.

За годы реформ значительно увеличился объем импорта рыбных товаров — сегодня каждый второй килограмм рыбной продукции, потребляемой жителями России, завозится из-за рубежа. При этом сырьевой экспорт до 80% составляет рыба-сырец и рыбные товары с низкой степенью переработки [4].

В то же время в области переработки гидробионтов имеются большие потенциальные возможности, которые могут служить дополнительными резервами получения пищевой кормовой продукции и БАД.

Помимо необходимости обновления флота, возобновления промысла в открытых частях мирового океана и освоения недоиспользуемых биоресурсов (кальмар, камбала, терпуг, сайка, минтай, сайра, отдельные виды сельди и др.), необходимо создание новых технологий комплексной безотходной переработки объектов водного промысла, включая использование отходов от основного производства (костей, внутренностей, кожи) и отдельных органов особи (молок, икры, гонад, печени).

Дополнительные резервы могут быть получены в связи с устранением неблагоприятных факторов, способствующих потерям массы обрабатываемого сырья и уменьшению выхода готовой продукции, снижающих биологическую ценность и функциональные свойства органических компонентов готовых изделий. К таким факторам относятся: высокие температуры, использование химических консервантов и агрессивных сред (кислот, щелочей, органических растворителей и т.п.), продолжительность и многостадийность технологических процессов.

Необходим новый подход к решению проблемы — поиск нетрадиционных, перспективных технологий, обеспечивающих глубокую переработку сырья, получение готовой продукции высокого качества.

В рыбоперерабатывающей отрасли до настоящего времени нет единой программы, определяющей четкую политику и стратегию по освоению объектов водного промысла, основной задачей которой явилось бы создание научной, экономической, законодательной базы, обеспечивающей максимальное использование биоресурсов, создание экологически чистой импортозамещающей отечественной пищевой и фармакологической продукции, доступной для всех слоев населения.

На наш взгляд, необходимо создание федеральной программы (проекта) по организации здорового питания на основе водных биологических ресурсов, иначе говоря, — специальной программы по морской биотехнологии, которая должна стать основным директивным документом для всех подразделений, занимающихся переработкой гидробионтов.

Недостаточное финансирование научно-исследовательских работ, дефицит квалифицированных кадров, слабый приток молодых специалистов требуют концентрации сил, координации направлений работ.

Для разработки и воплощения программы в жизнь необходимо объединение усилий всех заинтересованных сторон: научных учреждений, занимающихся обоснованием и разработкой продуктов питания для различных групп населения, производителей продуктов здорового питания, предприятий, реализующих продукцию, органов санэпиднадзора и других организаций, контролирующих качество и безопасность продукции.

Федеральная программа по морской биотехнологии должна решаться комплексно, с учетом региональных и целевых проектов и включать в себя следующие основные направления:

- Обеспечение качественного сохранения сырья. Этому вопросу в настоящее время уделяется недостаточное внимание — наблюдаются недопустимые колебания температуры хранения, используется повторное замораживание, на переработку направляется сырье с ослабленной консистенцией, признаками окислившегося жира, а из некачественного сырья невозможно получить качественную продукцию.

- Создание инновационных технологий глубокой переработки рыбы и морепродуктов с использованием щадящих режимов, исключающих применение агрессивных сред (кислот, щелочей, органических растворителей и т.п.), высоких температур, многостадийность и продолжительность обработки.

- Исследования по повышению эффективности использования водных биологических ресурсов. Возобновление изучения недоиспользуемых объектов открытых вод Мирового океана. Совершенствование процессов переработки рыбного сырья, контроля качества и безопасности гидробионтов и продукции, вырабатываемой из них.

- Совершенствование системы рационального питания, конструирование продуктов заданного химического состава, обогащенных незаменимыми нутриентами, позволяющими эффективно осуществлять коррекцию пищевого статуса различных групп населения.

- Анализ и оценка реальных и потенциальных рисков для здоровья человека, установление вероятности развития и степени выраженности неблагоприятных последствий для здоровья человека, обусловленных воздействием факторов среды обитания, процессов производства, эксплуатации, хранения, перевозки, реализации продукции.

- Обеспечение биобезопасности — предотвращение ущерба и обеспечение защищенности человека (государства) от традиционных, новых, потенциальных и реальных биологических угроз.

- Разработка экспресс-методов, унификация микробиологических и физико-химических методов контроля сырья и рыбной продукции в соответствии с требованиями стран Европейского содружества к продуктам питания.

- Создание системы по тестированию микробиологических культур и базы данных по микроорганизмам. Создание банка данных объективных показателей безопасности и качества сырья и продукции из водных биологических ресурсов. Определение предельно допустимых значений (ПДК) этих показателей для внесения в нормативную документацию — ГОСТы, технические регламенты и т.п.

- Идентификация видов рыб на молекулярном уровне с целью исключения фальсификации продукции, что особенно важно в связи с вступлением России в ВТО (импорт-экспорт). Создание Межгосударственного альбома.

- Выявление биологически активных веществ в морепродуктах, органах, внутренностях рыб, водорослях, получение на их основе БАД к пище, лечебно-профилактических и лечебных препаратов.

- Создание государственных нормативных документов, ГОСТов, технических регламентов, норм, методических указаний и т.д., соответствующих современному научно-техническому уровню, гармонизированных с международными требованиями, требованиями стран Европейского содружества к пищевой продукции.

Решение этих и многих других проблем невозможно без тесного международного сотрудничества, установления научных и деловых контактов, определения механизма совместной деятельности в области биотехнологических исследований и разработок.

Четкая и целенаправленная политика в области морской биотехнологии, организации здорового питания на основе водных биологических ресурсов, на наш взгляд, может заинтересовать федеральные органы исполнительной власти и органы исполнительной власти субъектов

Российской Федерации, отечественных и зарубежных инвесторов при ее практической реализации.

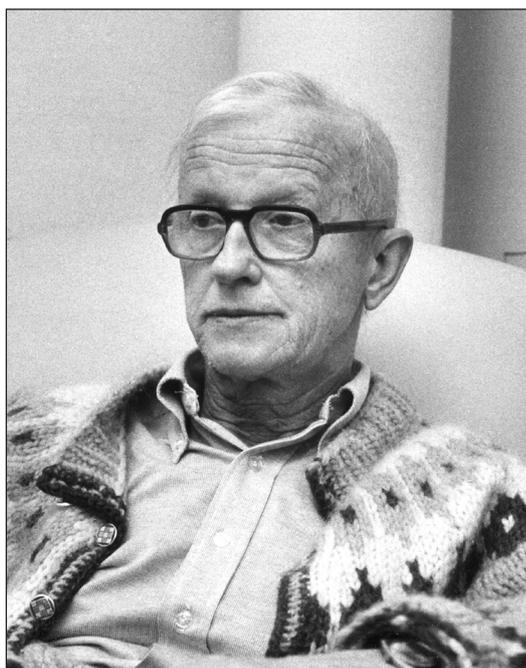
Литература

1. *Тутельян В.А.* Наука о питании: прошлое, настоящее, будущее. / Материалы VIII Всероссийского конгресса «Оптимальное питание — здоровье нации». — М.: ГУ НИИ питания РАМН., 2005. — С. 254–256.
2. *Подкорытова А.В., Сухвеева М.В.* Распределение, химический состав и использование ламинариевых водорослей дальневосточных морей / Материалы Первой Между-народной научно-практической конференции «Морские прибрежные экосистемы: водоросли, беспозвоночные и продукты их переработки». — М.: ВНИРО, 2002. — С. 174–182.
3. *Маслова Г.В.* Значение водных биологических ресурсов в решении проблем оптимального питания / Материалы Третьего Съезда общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. — М.: Макс-Пресс, 2005. — С. 154.
4. *Проселков В.Г.* Управление качеством и безопасностью рыбной продукции // Рыбная промышленность. — 2004. — № 1. — С. 2–5.

МАКС ДЕЛЬБРЮК – ПУТЬ ОТ ФИЗИКИ К БИОЛОГИИ: К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ И 25-ЛЕТИЮ СО ДНЯ СМЕРТИ

В.С. Воробьев*

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



Среди знаменитых имен XX столетия есть очень редкое, звучное – Макс Дельбрюк. И хотя оно не у всех на слуху, как, например, имена Бора, Эйнштейна, Уотсона, Крика, Полинга и т.д., тем не менее в профессиональной среде вызывает вполне однозначные адекватные ассоциации. Возможно, здесь есть тайна предопределенности, но так уж случилось, что правнуку Либиха, властителя дум в науке XIX века, выпала честь уже в XX веке совершить уникальное действие: привести физику в биологию. 100-летний юбилей со дня рождения и 25-летняя дата со дня смерти дают возможность вспомнить об ученом, проанализировать его научную деятельность и развитие как личности и исследователя.

Макс Людвиг Хеннинг Дельбрюк родился 4 сентября 1906 г. в Берлине. Он был последним, седьмым ребенком в семье известного профессора истории Берлинского университета Ганса Дельбрюка, 1848–1929 [2] (кстати, его дядя – абсолютный тезка Макс Дельбрюк, 1850–1919, – тоже профессор, только агрохимик [11]). По материнской линии, как уже указывалось, он приходился правнуком великому химику Юстусу Либиху. Так что будущий генетик и молекулярный биолог своей родословной подтверждал основные постулаты науки о наследственности: добротная порода – не помеха в научной работе, и кто знает – быть может, гены Либиха вместе с другими наилучшим образом скомбинировались в правнуке и принесли столь ценные плоды. Вырос он в берлинском пригороде – Грюнвальде, где по соседству жили семьи известных профессоров: физика Макса Планка, историка и богослова Адольфа фон Харнака, психиатра Карла Бонхоффера, математика Германа А. Шварца. С Харнаками Дельбрюки состояли в родстве (Адольф фон Харнак, 1851–1930, директор Прусской государственной библиотеки, президент Общества кайзера Вильгельма, был зятем бабушки Макса – дочери Ю. Либиха). Породнились они и с Бонхофферами: сестра Макса – Эмми – вышла замуж за сына Бонхоффера-старшего – Клауса. Такая особая, элитарная обстановка способствовала выбору профессии на академическом поприще. Макс предпочел вначале астрономию, затем его интересы постепенно переместились в сферу теоретической физики. Астрономические увлечения юности были достаточно серьезны: у Дельбрюков был домашний двухдюймовый телескоп, Макс по ночам часто смотрел в него, а над кроватью повесил портрет Кеплера (ему же он посвятил свою выпускную гимназическую речь). Естественно, он читал популярные книги о планетах и звездах. Большое влияние на него оказал старший сын профессора К. Бонхоффера Карл

* 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

Фридрих — впоследствии известный химик (он был на 8 лет старше, и такое покровительство сыграло позитивную роль).

По окончании гимназии в 1924 г. М. Дельбрюк поступил в университет Тюбингена, потом перешел в Берлинский университет. Одно время учился в Бонне, возвращался опять в свой родной город, пока, наконец, не обосновался в Геттингене. Здесь он проучился 3 года. Пытался писать диссертацию о возникновении новых звезд, однако по совету работавшего в университете специалиста по квантовой механике Макса Борна (лауреата Нобелевской премии 1954 г.) сменил тему и выполнил работу по математическому доказательству химического связывания лития, получив в 1930 г. докторскую степень по физике. Надо отметить, что в студенческие годы он много общался с энциклопедически образованным Вернером Броком — в будущем это помогло ему при формулировании философских обобщений в науке.

Далее последовала полуторагодовая стажировка в Бристольском университете (Великобритания). М. Дельбрюк очень ценил значение этой командировки. Помимо высокого содержательного уровня, овладения английским языком и знакомства с новой для него культурой, он подружился с молодыми физиками, которые вскоре стали основателями новой физики XX века, Нобелевскими лауреатами (Сесил Ф. Пауэлл и др.). После Бристоля он получил возможность на средства Рокфеллеровского фонда работать полгода в Копенгагене у Нильса Бора, а следующие полгода — в Цюрихе у Вольфганга Паули (после пребывания в Швейцарии Дельбрюк еще полгода поработал в Бристоле). Это время также было очень полезным для начинающего исследователя. Кроме постоянного общения с такими выдающимися людьми, как Бор и Паули, он установил товарищеские контакты с русским стажером Георгием Гамовым. В точных науках талант проявляется рано, он ищет выхода в самоутверждении, смелых гипотезах и т.д. Именно в эти годы Гамовым выполнена классическая работа о туннельном эффекте. Поэтому дружба со столь незаурядной личностью также не прошла для Дельбрюка бесследно. Они, кстати, выполнили совместную работу [35]. Примечателен факт, что когда Гамова не выпустили из СССР для участия в конференции в Риме в октябре 1931 г., то его доклад был зачитан Дельбрюком. Впоследствии, в 1972 г. М. Дельбрюк написал статью о друге своей молодости [28].

Но, безусловно, решающую роль в дальнейшей судьбе молодого ученого сыграл Бор [51, 57, 59]. Особенно произвел на него впечатление доклад Н. Бора

«Свет и жизнь» в августе 1932 г. в Копенгагене на Международном конгрессе по светолечению, в котором тот высказал мысль о возможности перенесения принципа дополнительности на изучение биологических явлений [17]. Эта идея волновала Дельбрюка многие десятилетия, он вел по данному поводу длительную переписку с Бором, в ней он видел возможность телеологической несводимости жизни к элементарным физико-химическим процессам, то есть редукционизму. Он сам рассказывал об этом 17 лет спустя так: «Предположение Бора о возможности дополнительности в биологии, по аналогии с физикой, стало главной причиной интереса к биологии, по крайней мере, одного физика и, возможно, играет сходную роль для других физиков, которые приходят в область биологии» [22].

В 1932 г. М. Дельбрюк вернулся в Берлин и приступил к работе в Химическом институте кайзера Вильгельма в должности ассистента отдела, руководимого Лизой Мейтнер (австрийкой по происхождению), которая вместе с Отто Ганом занималась ядерной физикой, облучая нейтронами тяжелые атомы тория и урана, что впоследствии привело к открытию ядерного расщепления. Гитлер еще не пришел к власти, обстановка для научной работы была хорошей и располагала к творчеству. Дельбрюк организовал у себя на дому семинар, где вместе с сотоварищами обсуждал научные проблемы.

В это же время произошло и судьбоносное для Дельбрюка знакомство с Н.В. Тимофеевым-Ресовским, у которого была лаборатория в Берлин-Бухе. Творческая, раскрепощенная атмосфера, созданная русским ученым, как нельзя лучше соответствовала стилю работы молодого Дельбрюка — уже сформировавшегося физикатеоретика, настроенного на познание глубинных основ изучаемых явлений. Вот как описывает события тех лет Н.В. Тимофеев-Ресовский: «В начале 30-х годов я сдружился и, так сказать, втянул в наши работы Макса Дельбрюка. Он был чисто теоретический физик, ученик Макса Борна и Нильса Бора. Я его, в сущности, переманил в биологию теоретическую. Он сейчас очень крупный вирусолог и теоретический биолог в Америке, нобелевский лауреат, вообще очень замечательный человек. Тогда он был молодой человек и, как смолodu все крупные теоретики, немножко нагловат, но это ничего. Мы с ним тоже нагло обращались, так что он обтесался очень быстро у нас и стал вполне приемлемым молодым человеком» [13]. Дельбрюк в своих автобиографических высказываниях по указанному поводу не прибегает к черному юмору, характерному для Николая Владимировича [30]. Он придерживается сугубо фактической

стороны дела, акцентируя внимание на содержательной сути вышедшей в 1935 г. работы о мутациях и структуре гена, выполненной совместно с Н.В. Тимофеевым-Ресовским и К.Г. Циммером. Это широко известная «Статья трех мужчин» или «Зеленая тетрадь» (по цвету оттисков, напечатанных в Геттингене), в которой изложены ставшие классическими хорошо обоснованные факты и объяснения радиационного мутагенеза и предполагаемой структуры гена [14, 15]. Об истинном отношении М. Дельбрюка к Н.В. Тимофееву-Ресовскому можно судить по такому факту, что вскоре после получения Нобелевской премии в декабре 1969 г. он приехал в Москву, навещил своего учителя, подарил ему анорак (куртку с капюшоном), а в состоявшихся тогда лекциях тепло отзывался о нем. Говорят, он ходил к президенту АН СССР М.В. Келдышу и ходатайствовал о судьбе опального ученого. В Нобелевской лекции сожалел, что Н.В. Тимофеев-Ресовский не прислал статью в сборник о фагах 1966 г., вышедший к 60-летию юбилею М. Дельбрюка.

Однако не внешние обстоятельства — главное в анализе пути ученого. Дело в том, что встреча с Н.В. Тимофеевым-Ресовским коренным образом изменила его линию жизни. Об этом очень точно сказал один из соавторов упомянутой статьи К.Г. Циммер: «...После нескольких месяцев Дельбрюк так заинтересовался количественной биологией и, в частности, генетикой, что он так и остался в этом поле деятельности навсегда» [63].

Начиная с середины 30-х годов научные интересы Дельбрюка необратимо перемещаются в сферу биологии. Правда, он публикует несколько работ по чисто физическим проблемам. В 1933 г. он напечатал краткую заметку [19], в которой предсказал когерентное рассеяние фотонов на кулоновском поле атомного ядра, которое позже назвали «дельбрюковским» и подтвердили в 1953 г. экспериментально [1, 4]. В 1936 г. он вместе с Гертом Мольером опубликовал работу по статистической квантовой механике и термодинамике [36].

Приоритет в возникшей стойкой привязанности Дельбрюка к биологии — это нацеленность на раскрытие механизма самовоспроизведения, репликации гена. Он искренне верил в плодотворность боровской идеи дополнительности применительно к жизненным явлениям. Великое озарение Н.К. Кольцова о матричном копировании наследственной молекулы, воплощенное в цикле речей и статей 20–30-х годов [5, 6, 7, 8, 12], провозглашенное в его афоризме «*Omnis molecula e moleculae*» и переданное по эстафете от его ученика Н.В. Тимофеева-Ресовского, запало в достаточно подготовленный к решению такой задачи мозг физика-теоретика. Все последующие

действия вплоть до 1953 года были посвящены только данной теме. Это было поле высокой интеллектуальной конкуренции, на котором господствовали в основном химики, однако Дельбрюк нашел в нем себя и занял подобающее место.

В 1937 г. он получил вторую Рокфеллеровскую стипендию и отправился в Пасадену (США), в Калифорнийский технологический университет (Калтех) для работы в лаборатории Т.Х. Моргана. Здесь он вначале занимался традиционной для этого коллектива темой — генетикой дрозофилы. Однако некоторое время спустя немецкий стажер заинтересовался генетикой бактериофага. По-видимому, он интуитивно почувствовал в этой разновидности вирусов удобную модель для расшифровки мучившего его репликативного принципа генного материала (между прочим, в своей записке 1937 г. «Загадка жизни» [20] он прямо утверждал, что вирусы — это молекулы, в чем его особенно убеждали только что появившиеся данные У.М. Стенли о кристаллизации вируса табачной мозаики). Результатом была совместная с биологом Эмори Элисом работа, опубликованная в 1939 г., в которой с использованием математических методов был проанализирован одиночный цикл размножения фага в отдельных клетках [39]. К этому же времени относится и появление оригинальной статьи в «Science» (1940) вместе с Лайнусом Полингом [56]. История публикации данной работы, так называемой «joint paper», заслуживает особого упоминания.

Летом 1940 г. Дельбрюк показал Полингу недавно напечатанную в Германии статью Паскуаля Йордана, одного из основателей квантовой механики, друга Дельбрюка по Геттингену. Полинг прочел ее, покритиковал, а через некоторое время принес свою статью для напечатания в журнале «Science» и предложил Дельбрюку: «Join me!» («Присоединяйтесь ко мне!»). У последнего не хватило сил отказаться, и «объединенная статья» вышла в свет. В ней подвергся сомнению вывод П. Йордана о возможности репликации молекул и воспроизведения идентичной структуры за счет квантовомеханического явления резонанса. Вопреки этому автору, в статье утверждалось, что принцип репликации гена включает синтез комплементарной структуры. Статья оказалась пророческой в том, что касается репликации ДНК, но не в отношении системы «антиген — антитело».

После начала 2-й Мировой войны в 1939 г. Дельбрюк остался в США и устроился на должность преподавателя физики в Университет Вандербильта в Нашвилле (штат Теннесси). Он, по сути, являлся гражданином враждебной страны, но и в этом статусе не потерял своего

научного потенциала. В 1940 г. на заседании физиологического общества в Филадельфии он познакомился с другим собратом по несчастью — врачом Сальвадором Лурией, эмигрировавшим из Италии (тот трудился в Колумбийском университете, в Нью-Йорке). Возникли общие интересы, сосредоточенные на изучении бактериофагов. Затем появилась четкая программа совместных действий. Дельбрюку отводилась роль — обеспечение строгих количественных и статистических методов исследования с целью точного измерения биологических эффектов. Так родилась знаменитая «фаговая группа», к которой вскоре (с 1943 г.) присоединился Алфред Херши из Вашингтонского университета (Сент-Луис). Война и большие расстояния не были помехой: они хорошо умели работать и взаимодействовать заочно, периодически встречаясь на курсах по проблеме бактериофагов, организованных Дельбрюком в лаборатории Колд-Спринг-Харбора (Нью-Йорк). Эти курсы проходили каждое лето и были посвящены количественным методам в биологии. Они приобрели большую популярность и собирали студентов — биологов, генетиков и физиков из разных стран (просуществовали они с 1945 до 1971 гг.). Курсы помимо образовательной миссии служили источником для пополнения талантливыми исследователями направления, связанного с изучением фагов, а затем и других вопросов молекулярной генетики. Например, на курсах бывали такие знаменитости, как Лео Сцилард, Ренато Дульбекко, Джеймс Уотсон [62], Гюнтер Стент и др. Фактически Дельбрюк воспроизвел на американской почве модель берлинского кружка единомышленников, созданного Н.В. Тимофеевым-Ресовским. Сейчас трудно оценить общую эффективность задуманного и осуществленного Дельбрюком дела, но *de facto* это и есть основание молекулярной биологии в целом как научного направления. Об этом, между прочим, говорит и сам Н.В. Тимофеев-Ресовский в своих мемуарах: «...Меня многие, особенно там, за рубежом, считают чем-то вроде деда этого направления. Потому что новая послевоенная редакция его была запущена Дельбрюком, а Дельбрюку соответствующую вещь я заправил в мозги в 30-е годы» [13]. И поэтому когда немцы называют М. Дельбрюка «Vater der Molekularbiologie» или говорят, что он загадку жизни не решил, а передал триумф ее решения Уотсону, то здесь нет преувеличения или необъективности в связи с возможным германским патриотизмом.

Но не только в этом заслуга Дельбрюка в развитии молекулярно-биологических исследований. Важен и его конкретный личный вклад. Что касается серии исследований фагов, то о первой работе 1939 г. вместе с

Э. Эллисом уже упоминалось. Второй значимый шаг в его собственных исследованиях фагов — это совместная с Лурией работа, напечатанная в 1943 г. [50]. В ней они предложили критерии, дающие возможность отличать мутации от других изменений, происходящих в бактериофагах и бактериях. Следующий решающий этап — 1946 год, когда независимо друг от друга М. Дельбрюк и А. Херши показали обмен генетической информацией между различными линиями бактериофагов при одновременном инфицировании бактерий несколькими бактериофагами, то есть дали первое экспериментальное доказательство генетической рекомбинации у вирусов [33, 44]. И венцом работы «фаговой группы» явился изящный эксперимент Алфреда Херши и Марты Чейз, выполненный в 1952 г., за год до открытия двойной спирали. Они обнаружили с помощью радиоизотопного метода (метки фосфором ДНК, а серой — белковой оболочки вируса), что ДНК является генетическим материалом бактериофагов [45].

В целом весь упомянутый цикл работ «фаговой группы» создал фундамент нарождающейся молекулярной биологии и послужил основой для интенсивного развития таких наук, как вирусология, онкология и др. Оценка ее вклада пришла не сразу, понадобилось время, чтобы все стало на свои места. Потрясающие открытия двойной спирали, ДНК-полимеразы, мРНК, тРНК, триплетного кода и т.д. как бы оттеснили на задний план достижения фаговых исследований. В 1966 г. вышла обобщающая книга о фагах, приуроченная к 60-летию со дня рождения М. Дельбрюка [18], и, наконец, в 1969 г. несколько запоздалая Нобелевская премия была присуждена трем выдающимся исследователям — Максудельбрюку, Алфреду Херши, Сальвадору Лурии «за открытия, касающиеся механизма репликации и генетической структуры вирусов». При вручении награды ведущая роль М. Дельбрюка была особо подчеркнута представителем Каролинского института Свенном Гардом.

Теперь следует вернуться к последовательному изложению жизни и деятельности Дельбрюка. Авторитет «враждебного иностранца», а затем иммигранта среди американских ученых рос, и в 1947 г. ему было предложено занять должность профессора биологии в Калтехе (его пригласил Дж.У. Бидл, возглавивший кафедру биологии в 1946 г. после смерти Т.Х. Моргана). Здесь он проработал 30 лет, до самой отставки в 1977 г., после чего его избрали членом правления института. В 1949 г. он был избран в Национальную академию наук США. Кроме того, он получил американское гражданство (1945). В 1941 г. М. Дельбрюк женился на Мэри Аделин Брюс

(1917–1998), с которой познакомился в Калтехе (у них родилось четверо детей — два сына и две дочери). Выбор оказался удачным — жена разделяла его научное кредо и жизненные позиции, обладала хорошим, подвижным характером, веселым нравом, что весьма импонировало мужу, чуждому всяких условностей и рисовки. Она, между прочим, была и соавтором одной из его научных работ «Бактериальные вирусы и пол» (1948 г.).

Есть еще один существенный момент. Он не был исследователем-одиночкой. Он являлся командным ученым, любил коллективный успех, торжество разума при установлении истины. Собственное имя часто отходило на второй план, поэтому список его печатных трудов сравнительно невелик. Не только публикации и формальные атрибуты деятельности профессора (преподавание и др.) были предметом его забот. Он представлял собой тип ученого-миссионера и проповедника науки, адепта сократовского метода. Сейчас трудно положить на чашу весов и определить, что дало больше для становления молекулярной биологии: его печатные произведения или его выступления, общение с научными лидерами и молодыми работниками. Хорошо известно, как он направлял в переписке аспиранта Лурии Дж. Уотсона в его исканиях модели ДНК, корректировал ошибки, давал советы. Ведь не случайно ему первому тот сообщил о своем открытии. Хотя позднее наставник был не в восторге от его автобиографической книги «Двойная спираль», вышедшей 15 лет спустя, особенно в связи с вольностями стиля [30].

Личность Дельбрюка не будет раскрыта, если не будет рассмотрена эпопея с публикацией напумевшей в 40-е годы книги Э. Шредингера «Что такое жизнь с точки зрения физики?» [58]. Дело в том, что Дельбрюк стал одним из главных действующих лиц в той теме, которую поднял прославленный физик: ему была посвящена отдельная глава книги под названием «Модель Дельбрюка». Отсроченная ретроспективная критика Лайнуса Полинга и Макса Перутца в книге в честь 100-летия Шредингера (1987) хотя и важна для истории, но не так интересна, как критика современников. Полинг сообщает, что он был разочарован чтением ее, а Перутц пеняет Шредингера на игнорирование химии. Среди критических замечаний 40-х годов наиболее остры таковые Г. Меллера [54]. Его можно понять: за год до получения Нобелевской премии признанный ученый, первооткрыватель радиационного мутагенеза даже не упомянут автором. Он отмечает ошибки в генетических терминах, констатирует недооценку химии, больше всего критикует эпилог, особенно за мистицизм. Тем не менее он считает книгу полезной для привлечения

внимания к проблемам биологии. Отзыв английского исследователя Дж. Холдейна в целом благоприятен, однако он критикует автора за неупоминание приоритета Н.К. Кольцова (1928) в постановке проблемы репликации генетического материала [42].

Какова же была реакция Дельбрюка? Он откликнулся сразу, напечатав в 1945 г. статью под названием «Что есть жизнь? Что есть истина?» [21]. И в ней, и позже он упрекает Шредингера в неполном охвате всей сущности работы 1935 года трех вышеупомянутых авторов, которая стала основой для многих биологических заключений австрийского физика. Дельбрюк не принимает критику Шредингером позиций Бора и Йордана о применимости квантовой неопределенности к биологическим явлениям. Хотя он тоже делает вывод о ценности книги для физиков, занимающихся биологией. Тема взаимоотношений Дельбрюка и Шредингера поднималась исследователями [51, 60].

Сложно в мемориальной статье делать категорические утверждения по столь обширной специальной теме, как содержательное и историческое значение шредингеровской книги. Однако несомненно одно — книга появилась в нужное время и сыграла огромную роль. Общий оптимизм при оценке возможностей точных наук в познании явлений жизни, категоричность суждений, лаконичность формулировок действовали на эмоции, завораживали молодых людей и звали их в настоящую науку. Одна фраза Шредингера «ген — аперидический кристалл» (обнародованная за 9 лет до открытия двойной спирали ДНК) звучит так же, как высказывание С.П. Королева в ответ на колебания коллег о возможной зыбкости лунного грунта: «Луна твердая!». А ведь Шредингер еще сделал предположение о генетическом коде по типу азбуки Морзе! Молодежь не любит сомнений, она верит авторитетному физику и хочет следовать его советам и указаниям. И она пришла в биологию. Парадоксально, но все три Нобелевских лауреата — Ф. Крик, Дж. Уотсон, М. Уилкинс, награжденные за открытие структуры ДНК в 1962 г., — обратились к генетической теме после прочтения «What is life». Можно добавить имена и других известных биологов — Г. Стент, С. Бенцер и др.: они также были очарованы Шредингером. А ведь книга воздействовала и на среднего читателя. Больше того, она не утратила интереса и для следующих поколений ученых: ее читали и в 50-е, и в 60-е, и в последующие годы. Поэтому эффект ее трудно измерим. Так что не зря англоязычные авторы часто называют эту книгу «influential book on biology» [38, 51]. И как доказательство положительного потенциала книги от противного, с помощью отрицательных фактов следует

упоминать, что Т.Д. Лысенко она очень не понравилась и ее переводчику на русский язык А.А. Малиновскому (сыну революционера и философа А.А. Богданова) им была воздана укоризна за «вредную» инициативу — перевод был напечатан в 1947 г., за год до сессии ВАСХНИЛ, на которой была разгромлена отечественная генетика.

Есть еще важный рубеж в жизни Дельбрюка — 1953 год. Так случилось, но именно в этот год ученый отошел от генетической тематики и переключился на нейробиологию. Он обратился к очень специфической проблеме сенсорной трансдукции у спонгиофоров рода *Rhizomyces*. Это простейший гриб, реагирующий на свет идвигающийся в его направлении. Данной проблемой он занимался на протяжении длительного времени (50–70-е годы), опубликовав серию работ [27, 29, 34]. Уровень исследований по сенсорной физиологии методически был высок, но в целом по интегральной роли в биологии он уступал тому, который был достигнут им в предыдущих изысканиях по молекулярной генетике, особенно в фаговом цикле. Смена темы для научного работника — обычное дело. Однако для истории важно выяснить побудительные причины этого.

Известно, что добившись сверхпризнания в генетике, Крик и Ниренберг, так же, как и Дельбрюк, занялись нейробиологией: первый искал структурно-химические основы следовых процессов в мозгу (в частности, в актиновых комплексах постсинаптической цитоплазмы), второй изучал нейробластоми. Возможно, это чистое совпадение. Какие-то обобщения на этот счет сделать трудно. А проанализировать документальные свидетельства на примере Дельбрюка — это можно сделать на основании воспоминаний его учеников. Так, Г. Стент (1998) сообщает следующее [59]. В лабораторной беседе за ленчем в конце 1949 г. Дельбрюк заявил: «Мне кажется, что фаговые исследования сейчас в хороших руках. Все тонкие работы, которые ведутся теперь, вскоре приведут к пониманию биологического самовоспроизведения [«self-replication»]». На ремарку Стента, надо ли считать, что проблема ауторепликации будет решена без встречи с парадоксами, Дельбрюк сказал: «Да, я начинаю так думать». «А как же другие законы физики?» — заметил ученик, на что учитель ответил так: «После того как фаговые исследования раскрыли загадку ауторепликации, остается еще даже более сложная проблема, которую ставят живые создания. Я имею в виду мозг, для которого подходящие механизмы даже нельзя представить. Я уверен, что понадобятся другие законы физики, чтобы объяснить функцию этого загадочного ансамбля атомов во вселенной, чтобы объяснить,

как сознание возникает из материи». В будущем на тему мозга и сознания будет опубликована его книга (правда, она вышла посмертно на английском и в переводе на немецкий язык) под названием «Разум из материи?» [31, 32], которая носит, главным образом, постановочный, гносеологический характер. Это были лекции, прочитанные ученым в Калтехе в 1974–1975 гг.

Вышеуказанная беседа состоялась за два года до событий 1952–1953 гг., когда были совершены существенные прорывы в молекулярной биологии — идентификация ДНК в фаге в качестве генетического материала и открытие двойной спирали ДНК. И вот это произошло. То, к чему стремился Дельбрюк 20 лет, было сделано. Пищи для ума физика-теоретика здесь (в вопросе о репликации) больше не оставалось. В таком контексте можно понять резкий поворот в научном курсе ученого. Только нужно дать краткий комментарий к восприятию Дельбрюком корректности модели Уотсона — Крика. В правильности ее он не сомневался ни в 1953 г. (об этом свидетельствуют письмо к Бору по горячим следам, в котором он сравнивает их открытие с открытием Резерфордом атомного ядра, а также его последующие высказывания и интервью), ни позже. Однако он выступал против упрощения проблемы репликации в целом [30].

Тем не менее не должно складываться впечатление о полном отходе исследователя от вопросов молекулярной биологии. Сенсорная физиология — это был его личный интерес, а как профессор Калтехе в своей лаборатории он по-прежнему в 50–60-е годы поддерживал генетические работы и общался с мировыми лидерами данного направления. Так, например, Г. Стент продолжал заниматься проблемой репликации ДНК и в середине 50-х годов вышла его статья по этому вопросу совместно с М. Дельбрюком [37], а также отдельная статья самого Дельбрюка (1954) [23]. Кроме того, в последующем его интересовала проблема строения мембраны.

Ясно, что в послевоенные годы ученого-эмигранта не могла не волновать судьба родного отечества. К его чести надо сказать, что он много сделал для возрождения науки в Германии, и поэтому не случайно ему впоследствии были оказаны неординарные посмертные почести (об этом ниже). Во время отпуска, взятого за свой счет, он в течение трех лет (1961–1963) находился в ФРГ на должности приглашенного профессора в Кельнском университете, где создал Институт молекулярной генетики. Интересно, что на открытии института 22 июня 1962 г. выступил Нильс Бор с актовой лекцией «Light and Life — Revisited», в которой он дал комментарий к своей лекции на эту же тему в Копенгагене 30-летней

давности (это было последнее публичное выступление ученого). Кроме того, в 60-е годы Дельбрюк помогал развернуть молекулярно-биологические исследования во вновь созданном университете в Констанце. В это время он после долгого перерыва возобновил публикации на немецком языке [24, 29].

М. Дельбрюк, помимо Нобелевской премии, был отмечен многими званиями и наградами. Он состоял членом Лондонского королевского общества, Французской академии наук, Датской королевской академии, имел почетные степени ряда университетов (Гейдельберг, Геттинген, Копенгаген, Гарвард, Чикаго), был удостоен Кимберовской медали по генетике Национальной академии наук США (1964), медали Грегора Менделя Германской академии естествоиспытателей «Леопольдина» (1967) и др.

В числе его концептуальных выступлений есть два главных: лекция «Взгляд физика на биологию» (1949) [22] — здесь по названию он как бы вторит Шредингеру (хотя о нем не упоминает) — и «Обновленный взгляд физика на биологию — двадцать лет спустя» (1969) [3, 25, 26] — его Нобелевская лекция. Это уникальные документы, которые помогают воссоздать подлинную историю науки XX века.

Скончался М. Дельбрюк 10 марта 1981 года после тяжелой болезни (злокачественная опухоль костного мозга), которой он страдал последние годы жизни. Незадолго до смерти он, как и многие двуязычные лица, перешел с чужого языка на родной — язык Гете (известно, что и Тургенев, умерший на чужбине, перед кончиной сменил изящный французский на простой русский язык). Похоронен в Пасадене, городе близ Лос-Анджелеса, где проработал около 40 лет. Намерение написать автобиографию осталось нереализованным, хотя он ставил такую задачу в последний период своей жизни.

В целом перед нами проходит большая, красивая жизнь незаурядного человека. В ней были и радостные и горестные страницы. Ему пришлось в юности перенести голод и лишения, связанные с Первой мировой войной и революцией, в зрелые годы — смерть родных и близких во Второй мировой войне (среди них были и лица, репрессированные нацистами; досталось родне Дельбрюка и от наших соотечественников). Ему выпало счастье близко общаться с наиболее выдающимися физиками, химиками и биологами XX столетия.

Это был чрезвычайно остроумный человек. На всех фотографиях в молодые да и в более поздние годы он всегда веселый, с открытой, приветливой улыбкой, готовый к шутке, импровизации, экстравагантному пос-

тупку, мистификации. Его неистощимое чувство юмора отмечали многие друзья и биографы. Излишне говорить о том, что он, получивший столь изысканное воспитание и образование, был всесторонне развитой личностью, любил и понимал философию, музыку, поэзию (особенно Рильке).

В Калтехе имеется довольно подробная иконография ученого. Тонкие аристократические черты лица заметно напоминают портрет его именитого прадеда. Сходство фенотипов выдающихся людей в генеалогическом древе — еще один предмет для размышлений медицинских генетиков. Есть и еще о чем подумать — С. Очоа был последним седьмым ребенком, М. Дельбрюк — тоже седьмым и тоже последним (его мать также была последней), Д.И. Менделеев — последним 17-м (14-м живокрещенным), И.И. Мечников — пятым, младшим, Н.И. Пирогов — 13-м предпоследним (14-й умер младенцем), А. Флеминг (восьмым из девяти) и т.д. Ясно, что у этой идеи есть антитеза: так, например, И. Кеплер был первенцем и т.д. (а как быть с доношенностью и другими факторами?!). О генетических коррелятах гениальности много писал В.П. Эфроимсон, но данная тема выходит за рамки статьи. Хотя, конечно, хотелось бы дать информацию для профессионалов в этой области.

Древо Либиха более-менее разработано. Бабушка М. Дельбрюка была дочерью Либиха, а дед (отец матери — Лины Тирш) — профессор хирургии в Лейпциге. А вот с Дельбрюками еще предстоит разобраться. Сам Макс Дельбрюк больше всего внимания, естественно, уделит отцу. Однако известно, что род Дельбрюков на протяжении XIX века дал Германии несколько поколений известных историков, государственных деятелей, филологов, поэтов и т.д., и надо сказать, что их полное генеалогическое древо пока не построено. Хотя одна из ветвей этого рода прослежена. Она берет начало из города Оснабрюка. Центральной фигурой здесь является Мартин-Фридрих-Рудольф Дельбрюк (1817–1903), крупный государственный деятель Пруссии, министр, правая рука Бисмарка, позднее разошедшийся с ним. У Рудольфа Дельбрюка было 3 внучатых племянника, один из которых — Ганс — стал отцом Макса (о нем уже говорилось выше). Двое других внучатых племянника также знамениты: один — Бертольд Дельбрюк (1842–1922) — известный специалист в области сравнительного языкознания и санскрита, профессор в Иене, другой — Клеменс фон Дельбрюк (1856–1921), кузен Бертольда, был прусским министром торговли и ремесел и занимал другие важные государственные посты [16, 52]. Следует также отметить, что Дельбрюки были близки к королевскому

двору. Так, например, Иоганн-Фридрих Дельбрюк (1768–1830) был воспитателем будущих правителей Германии — короля Фридриха-Вильгельма IV (написал об этом книгу в 3 томах) и императора Вильгельма I. Отец же Макса Дельбрюка в молодости был приглашен воспитателем к принцу Вольдемару прусскому [16].

В заключение необходимо остановиться на той благодарной памяти об ученом на родной земле, которая сохраняется после его смерти. В 1992 г. на северо-востоке Берлина, в Берлин-Бухе на базе трех институтов бывшей Академии наук ГДР был открыт Центр молекулярной медицины имени Макса Дельбрюка. Этот центр по традиции ориентирован на практическую медицину, поскольку издавна, с момента создания здесь в 1928 г. Кайзер-Вильгельм-Института по изучению мозга (основатель — Оскар Фохт, крупный невролог, исследователь мозга В.И. Ленина, личный врач Круппа) находился в комплексной связи с берлинскими клиниками (Шаритэ). Ныне Центр взаимодействует с сердечно-сосудистой и онкологической клиниками, расположенными здесь же, в Берлин-Бухе. Почему именно в этом месте увековечена память Дельбрюка? Как указывалось выше, в Берлин-Бухе молодой Дельбрюк трудился вместе с Н.В. Тимофеевым-Ресовским (в честь последнего установлена памятная доска на здании, где он работал).

Научные направления Центра М. Дельбрюка посвящены сердечно-сосудистым и онкологическим заболеваниям, болезням обмена, расстройствам нервной системы. При Центре функционирует Биотехнологический парк, в котором имеется около 30 предприятий, где более 500 работников производят диагностикумы и векторы для генотерапии.

В Центре работают примерно 750 сотрудников. Он финансируется на 90% из федерального бюджета (Федерального министерства образования и науки), на 10% — из земельного. Его базовый годовой бюджет составляет 50 млн. евро. Центр входит в число 15 научно-исследовательских институтов Ассоциации национальных научных центров имени Германа фон Гельмгольца. Таким образом, мемориальный Центр физика и биолога Макса Дельбрюка по праву вошел в число институтов, носящих имена созвездия великих немецких физиков — Германа фон Гельмгольца и Макса Планка (институтов М. Планка около 80), которые пришли на смену системе институтов кайзера Вильгельма.

Биографические и аналитические данные о М. Дельбрюке представлены рядом авторов и справочными изданиями и энциклопедиями [9, 10, 40, 41, 43, 46, 47, 48, 49, 53, 54, 55, 61]. Очень ценным автобиографи-

ческим документом является его устное интервью 1978 г. [30]. Наиболее полную его библиографию см. [43]. Полезны также Интернет-материалы.

Литература

1. Ахмадалиев Ш.Х., Каерашвили Г.Я., Клименко С.Г. и др. Дельбрюковское рассеяние фотонов в кулоновском поле при энергиях 140–450 МэВ. — Новосибирск, 1998. — 23 с. (см. также статьи в энциклопедиях).
2. Дельбрюк Ганс. История военного искусства в рамках политической истории. Пер. с нем. Т. 1–3. — М.: Античный мир, 1994–1996 (1-е переводное издание вышло в свет в 1930–1939 гг., а немецкий оригинал — в Берлине в 1900–1936 гг., в 7 томах).
3. Дельбрюк Макс. Обновленный взгляд физика на биологию (Двадцать лет спустя). Пер. с англ. // Успехи физ. наук. — 1971. — Т. 105. — Вып. 3. — С. 393–401 (см. № 25, 26).
4. Дельбрюковское рассеяние / В кн. Физическая энциклопедия. www.physicum.narod.ru
5. Кольцов Н.К. Физико-химические основы морфологии / Труды Третьего Всероссийского съезда зоологов, анатомов и гистологов в Ленинграде 14–20 декабря 1927 г. — Л., 1928. — С. 39–41 (речь на I пленарном заседании съезда; напечатана также в серии «Новейшие течения научной мысли», № 12, Госиздат, 1929 и в книге «Организация клетки», 1936).
6. (Кольцов Н.К.) Koltzoff N.K. Physikalisch-chemische Grundlage der Morphologie // Biologisches Zentralblatt. — 1928. — Bd. 48.
7. (Кольцов Н.К.) Koltzoff N.K. Science, 1934 October 5th.
8. Кольцов Н.К. Организация клетки. Сборник экспериментальных исследований, статей и речей 1903–1935 гг. — М.—Л.: Гос. изд-во биол. и мед. лит-ры, 1936. — С. 461–490, 585–622, 623–648 (3 статьи о физико-химических основах наследственности).
9. Лауреаты Нобелевской премии. Энциклопедия: пер. с англ. В 2-х т. Т. 1. — М.: Прогресс, 1992. — С. 402–404.
10. Марьянович А.Т., Князькин И.В. Взрыв и цветение. Нобелевские премии по медицине 1901–2002. — СПб.: Издательство ДЕАН, 2003. — С. 115–123.
11. Меркер М.Г. Руководство к винокуренному производству. Перераб. вновь д-ом Максом Дельбрюк, имп. т. с., проф., Королевского Высшего с.-х. училища и дир. Берлинского ин-та брожения. Полный перевод 8-го нем. изд. со всеми рис., табл. и добавлением рис. и описаний некоторых аппаратов рус. Машиностроительных фирм / Под ред. зав. Винокуренным отд-нием Микулинско-Городищенск. с.-х. школы 1-го разряда инж.-тех. А.А. Фукс. — Тверь, Л.Ф. Бухмейр, 1904 [1907]. Это — перевод с нем. ра-

- боты дяди Макса Дельбрюка младшего. Есть еще работа М. Дельбрюка старшего на нем., напр.: *Delbrueck Max. Ueber die Fortschritte der Gaerungschemie in den letzten Decennien // Ver. Dt. Chem. Ges. — 1898. — Bd. 31. — S. 1913—1925.*
12. (Тимофеев-Ресовский Н.В.) *Timofeeff-Ressovsky N.W. N.K. Koltzoff. Nachruf // Die Naturwissenschaften. — 1941. — Jg. 29. — N. 9. — S. 121—124 (перевод на русский яз.: ж-л «Человек», 2000, № 3).*
 13. Тимофеев-Ресовский Н.В. Воспоминания / Сост. Н.И. Дубровина. — М.: Издательская группа «Прогресс», «Пангея», 1995. — 384 с.
 14. Тимофеев-Ресовский Н.В. Избранные труды / Ред. О.Г. Газенко, В.И. Иванов. — М.: Медицина, 1996. — 479 с.
 15. (Тимофеев-Ресовский Н.В. и др.) *Timofeeff-Ressowsky N.W., Zimmer K.G., Delbrueck Max. Ueber die Natur der Genmutation und der Genstruktur // Nachr. Ges. Wiss. Goettingen, Math.-Phys. Klasse, Fachgr. 6, N.F. — 1935. — Bd. 1. — N 13. — S. 189—245.*
 16. *Энциклопедический словарь / Брокгауз Ф.А. и Ефрон И.А. Т. 10. — СПб., 1893. — С. 346—347.*
 17. *Bohr Niels. Light and life // Nature. — 1933. — Vol. 131. — P. 421—423, 467—459.*
 18. Cairns J., Stent G.S., Watson J.D. (eds.) *Phage and the origins of molecular biology. — Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1966 (expanded ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000, 366 p.; 2006 — юбилейное расширенное издание, 370 с.).*
 19. *Delbrueck Max. Zusatz bei der Korrektur / Appendix to L. Meitner and H. Koesters. Ueber die Streuung kurzweiliger g-Strahlen // Ztschr. fuer Physik. — 1933. — Bd. 84. — S. 137—144, 144 (предсказание «дельбрюковского рассеяния»).*
 20. *Delbrueck Max. Riddle of life. — Berlin, August 1937 (note, published as Appendix to Nobel Lecture, 1969).*
 21. *Delbrueck Max. What is Life? What is Truth? // Quarterly Review of Biology. — 1945. — Vol. 20. — P. 370—372.*
 22. *Delbrueck Max. A physicist looks at biology // Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences. — 1949. — Vol. 38. — P. 173—190 (reprinted in: Phage and the origins of molecular biology. Ed. J. Cairns, G.S. Stent, J.D. Watson. — Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1966. — P. 9—22).*
 23. *Delbrueck Max. On the replication of deoxyribonucleic acid (DNA) // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 1954. — Vol. 40. — P. 783—788.*
 24. *Delbrueck Max. Ueber Vererbungsschemie. — Koeln: Westdt. Verl., 1963. — 39 S.*
 25. *Delbrueck Max. A physicist's renewed look at biology — twenty years later. Nobel Lecture, December 10, 1969 (<http://nobelprize.org/>) (см. также № 26).*
 26. *Delbrueck Max. A physicist's renewed look at biology: twenty years later // Science. — 12 June 1970. — Vol. 168 (3937). — P. 1312—1315 (см. также № 25).*
 27. *Delbrueck Max. Signal transducers: Terra incognita of molecular biology // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. — 1972. — Vol. 11. — P. 1—7.*
 28. *Delbrueck Max. Out of this world / In: Cosmology, Fusion and Other Matters (George Gamov Memorial Volume) (ed. F. Reines). — Boulder, Colorado: Colorado Associated University Press, 1972.*
 29. *Delbrueck Max. Anfaenge der Wahrnehmung. Untersuchungen ueber d. Mechanismus d. Wandlung von Sinnessignalen bei Phycomyces. — Mainz: Akademie der Wiss. u. d. Literatur, 1974. — 48 S.*
 30. *Delbrueck Max. Interview by Carolyn Harding. Pasadena, California, July 14 — September 11, 1978. Oral History Project, California Institute of Technology Archives. Retrieved 30.04.06 from the World Wide Web: http://resolver.caltech.edu/caltechOH:OH_Delbruck_M*
 31. *Delbrueck Max. Mind from matter. — Blackwell Scientific Publishers, Oxford, 1986 (имеется также публикация тем же издательством в Palo Alto, 1985 — Mind from matter? An essay on evolutionary epistemology).*
 32. *Delbrueck Max. Wahrheit und Wirklichkeit. Ueber die Evolution des Erkennens. Aus d. Engl. von Ernst Peter Fischer. — Hamburg: Rasch and Roehring, 1986. — 363 S.*
 33. *Delbrueck Max and Bailey W.T. jr. Induced mutations in bacterial viruses // Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. — 1946. — Vol. 11. — P. 33—37.*
 34. *Delbrueck Max and Cohen R. Photoreactions in Phycomyces, growth and the tropic responses to the stimulation of narrow test area // J. gen. Physiol. — 1959. — Vol. 42. — P. 677—695.*
 35. *Delbrueck Max and Gamov G. Uebergangswahrscheinlichkeiten von angeregten Kernen // Z. Phys. — 1931. — Bd. 72. — S. 492—499.*
 36. *Delbrueck Max and Moliere G. Statistische Quantenmechanik und Thermodynamik // Abh. d. K. Preuss. Akad. d. Wiss., Phys.-Math. Klasse. — 1936. — N 1. — S. 1—42.*
 37. *Delbrueck Max and Stent G.S. / In: A Symposium on the Chemical Basis of Heredity. W. D. McElroy and B. Glass, eds. — Baltimore: The Johns Hopkins Univ. Press, 1957. — P. 699—736.*
 38. *Dronamraju Krishna R. Erwin Schroedinger and the origins of molecular biology // Genetics. — 1999. — Vol. 153. — P. 1071—1076.*
 39. *Ellis E., Delbrueck Max. The growth of bacteriophage // J. Gen. Physiol. — 1939. — Vol. 22. — P. 365—384.*
 40. *Fischer E.P. Das Atom der Biologen: Max Delbrueck und d. Ursprung d. Molekulargenetik. — Muenchen: Piper, 1988. — 282 S.*

41. Fisher E.P. and Lipson C. Thinking about science: Max Delbrueck and the origins of molecular biology. – New York: W.W. Norton, 1988. – 334 p.
42. Haldane J.B.S. A physicist looks at genetics // Nature. – Vol. 156. – P. 375–376.
43. Hayes W. Max Ludwig Henning Delbrueck // Biogr. Mem. Fellows R. Soc. (London). – 1982. – Vol. 28. – P. 59–90.
44. Hershey A.D. Mutations of bacteriophage with respect to type of plaque // Genetics. – 1946. – Vol. 31. – P. 620–640.
45. Hershey A.D. and Chase M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage // J. Gen. Physiol. – 1952. – Vol. 36. – P. 39–56.
46. Judson H.F. The eighth day of creation: makers of the revolution in biology. – New York: Simon and Schuster, 1979. – 686 p. (expanded ed. – NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996, 714 p.).
47. Kay L.E. Conceptual models and analytical tools: The biology of the physicist Max Delbrueck // J. of the History of Biology. – 1985. – Vol. 18. – P. 207–246.
48. Keller E.F. The century of the gene. – Harvard Univ. Press, 2000.
49. Luria Salvador E. A slot machine. A broken test tube: An autobiography. – New York: Harper and Row, 1984.
50. Luria S.E., Delbrueck Max. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance // Genetics. – 1943. – Vol. 28. – P. 491–511.
51. McKaughan D.J. The influence of Niels Bohr on Max Delbrueck // Isis. – 2005. – Vol. 96. – P. 507–529.
52. Meyers Grosses Universal Lexikon im 15 Baenden. Bd. 3. – Bibliographisches Institut, Mannheim-Wien-Zuerich, 1981. – S. 471–472.
53. Morange M. A history of molecular biology. – Cambridge, MA: Harvard University Press, 1998.
54. Muller H.J. A physicist stands amazed at genetics // J. Hered. – 1946. – Vol. 37. – P. 90–92.
55. Nobel lectures. Physiology or Medicine, 1963–1970. – Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1972.
56. Pauling Linus and Delbrueck Max. The nature of intermolecular forces operative in biological processes // Science. – 1940. – Vol. 92. – P. 77–79.
57. Roll-Hansen Nils. The application of complementarity to biology: from Niels Bohr to Max Delbrueck // Historical Studies in the Physical and Biological Sciences. – 2000. – Vol. 30. – P. 417–442.
58. Schroedinger E. What is life? The physical aspect of the living cell. – Cambridge: Cambridge University Press, 1944 (есть русский перевод: Что такое жизнь с точки зрения физики? – 1947).
59. Stent G.S. Looking for other laws of physics // J. of Contemporary History. – 1998. – Vol. 33. – P. 371–397.
60. Symonds N. Schroedinger and Delbrueck: their status in biology // Trends Biochem. Sci. – 1988. – Vol. 13. – P. 232–234.
61. The encyclopedia americana. Vol. 8. – 1973. – P. 665.
62. Watson J. D. Growing up in the phage group / In: Phage and the origins of molecular biology (Eds. J. Cairns, G.S. Stent, and J. D. Watson). – Cold Spring Harbor Laboratory of Quantitative Biology, Cold Spring Harbor, New York, 1966. – P. 239–245.
63. Zimmer K.G. The target theory / In: Phage and the origins of molecular biology (Eds. J. Cairns, G.S. Stent, and J.D. Watson). – Cold Spring Harbor Laboratory of Quantitative Biology, Long Island, New York, 1966. – P. 33–42.

Были использованы Интернет-материалы, в том числе: <http://www.creatingtechnology.org/biomed/dna.htm>; <http://oralhistories.library.caltech.edu/16/>; <http://de.wikipedia.org/>; <http://nobel.se/>; <http://dispatch.opac.ddb.de/DB=4.1/REL?PPN=120256568>

Резюме. В связи со 100-летием со дня рождения и 25-летием со дня смерти проведен анализ биографии и научных исследований Макса Дельбрюка. Дан также список его печатных трудов и биографий.

Ключевые слова: история науки, молекулярная биология, персоналия, биографии, Макс Дельбрюк.

MAX DELBRUECK – PATH FROM PHYSICS TO BIOLOGY: TO CENTENARY FROM THE DATE OF BIRTH AND 25TH ANNIVERSARY OF HIS DEATH

V.S. VOROBYEV

Ovchinnikov Society of Biotechnologists of Russia, Moscow

The analysis of Max Delbrueck's biography and his researches on the occasion of centenary from the date of birth and 25th anniversary of his death was carried out. The list of his publications and biographies was given also.

Keywords: science history, molecular biology, personnel, biographies, Max Delbrueck.

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2006 ГОДА

СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

К 70-летию выхода книги

Н.К. Кольцова «Организация клетки» (1936)*

Кольцов Н.К. Организация клетки. Сборник экспериментальных исследований, статей и речей 1903–1935 гг. — М.—Л.: Гос. изд-во биол. и мед. лит-ры, 1936. — 652 с.

Ровно 70 лет назад, в 1936 г. произошло знаменательное событие для отечественной да и, пожалуй, мировой биологии — вышла в свет книга «Организация клетки», написанная одной из самых ярких фигур в биологии XX века — Николаем Константиновичем Кольцовым. Он, как бы предчувствуя свою трагическую судьбу (в 1940 г. он умрет, загнанный бесчисленными критиками, в Ленинграде от инфаркта миокарда, а затем соотечественники — паранаучные мракобесы — на четверть века вычеркнув его имя из всех руководств и учебников), собрал все свои лучшие работы и опубликовал в одном объемистом томе, что фактически стало его избранными трудами, изданными при жизни автора. По сути дела, это был реквием великого ученого. В 1936 г. скончался друг (они познакомились и сблизилась на Неаполитанской станции) и могучий покровитель Н.К. Кольцова — Максим Горький, который сдерживал шквал его травли и преследования. Дальше шариковым и швондерам от науки понадобилось 4 года, чтобы свести в могилу столь редкостного человека, красу и гордость России.

Это сборник экспериментальных исследований, статей и речей за 1903–1935 гг. Автор посвятил его 100-летию клеточной теории. В нем объединены его классические работы о форме клетки и цитоскелетных структурах (на примере спермиев десятиногих раков) и т.д. Особое место в книге занимают помещенные в конце тома три большие работы (объемом около 200 стр.), интересные в контексте тематики журнала «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова»: «Физико-химические основы морфологии» (с. 461–490), «Наследственные молекулы» (с. 585–622), «Роль гена в физиологии развития» (с. 623–648).

Сейчас принято при оценке исторического вклада Н.К. Кольцова в проблему репликации наследственных молекул упоминать только его публикацию 1928 г. в «Biologisches Zentralblatt» (иностранные авторы) или доклад на III Всесоюзном съезде зоологов, анатомов, гистологов в декабре 1927 г. (отечественные авторы). А ведь у Н.К. Кольцова к 1936 г. уже накопилось несколько работ по данной теме, в том числе и публикации в «Science» (1934), «Биол. журнале», «Науке и жизни» (1935) и др. И все это он предусмотрительно собрал в упомянутом сборнике.

В связи с юбилейной датой следует кратко рассказать о сущности идей, развиваемых автором, их генезе и аргументации. Что особенно важно — в книге есть авторский рассказ о напряженном 30-летнем думании ученого над проблемой упаковки генетического материала в миниатюрной «таре» головки сперматозоида. Дума эта запала в пытливую голову молодого студента в 1894 г. на IX съезде русских естествоиспытателей и врачей под влиянием выступления профессора химии Колли о том, что все наследственные особенности передаются через очень небольшое количество молекул, которые могут поместиться в головке сперматозоида (это сильно противоречило общераспространенным тогда взглядам биологов, в том числе и учителя Н.К. Кольцова — профессора Московского университета М.А. Мензбира). Существенно, что русский ум с честью выдержал это испытание временем и все-таки породил беспрецедентную ассоциацию о возможности самовоспроизведения биологических молекул, выдвинув гипотезу, что хромосома — это молекула или пучки молекул. В 1927–1928 гг. Н.К. Кольцов первым в мире смело заявил, что вслед за принципами «Omne vivum ex ovo» («Все живое — из яйца»), «Omnis cellula e cellulae» («Каждая клетка — от клетки»), «Omnis nucleus e nucleo» («Каждое ядро — от ядра») возможен и тезис «Omnis molecula e moleculae» («Каждая молекула — от молекулы»). В соответствии с научными традициями он широко оповестил об этом научную общественность в публичных выступлениях, напечатал статьи на немецком и русском языках (в том числе в статье «Биология» в 1-м издании БСЭ) и рассказал Прибраму. Надо отметить, что авторитет Н.К. Кольцова в мире был огромен, и факт не остался незамеченным. Вообще для Н.К. Кольцова поиск физико-химических основ живого постоянно был в центре внимания. Он сам об этом пишет так: «Моим стремлением всегда было

* Материал подготовлен О.В. Воробьевой

довести эти слагаемые [части живого организма] до простоты химических и физических процессов, протекающих в молекулярных структурах...». Отсюда нередки упреки в его адрес в механицизме.

Впоследствии в 30-е годы возникла дискуссия между учеными в переписке и в журналах. Так, например, если Н.К. Кольцов репликативные свойства приписывал генам — белковым молекулам, то Демерец — тимонуклеиновой кислоте (ДНК). Правда, иногда на свободном конце гипотетической структуры гена Н.К. Кольцов помещал тимонуклеиновую кислоту (рис. 4 в статье «Роль гена в физиологии развития», стр. 631). Сейчас сложно проводить ретроспективные линии и выяснять, кто оказался более прав. Важно, что даже если русский ученый оказался неправ в деталях, то был прав по существу в магистральной идее самоудвоения и матричного синтеза в присутствии затравки. Он уверенно заявлял: «Физиологический синтез такой сложной молекулы, какой мне рисуется генома [то есть «продольная нить, состоящая из ряда генов»], невероятен». Остается — репликация, кристаллизация и т.д. Кроме того, принципиально и то, что он возбуждал саму дискуссию и стимулировал исследования по данной проблеме.

Но есть еще одно непреложное следствие кольцовского открытия. Он передал свои знания и убежденность в возможности молекулярной репликации своему ученику Н.В. Тимофееву-Ресовскому, а тот, попав за границу, широко разнес их среди мирового научного сообщества. Исторические последствия указанного факта общеизвест-

ны: работы берлинской группы в 30-е годы с участием М. Дельбрюка, реакция на нее Э. Шредингера в 40-е годы и т.д.

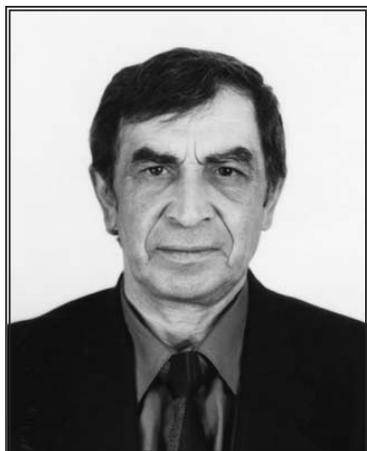
В заключение целесообразно привести несколько цитат из статей Н.К. Кольцова в книге «Организация клетки». Напомним, что воспроизведение наследственной молекулы он понимал как процесс «ассимиляции», то есть уподобления путем кристаллизации на затравке (шаблоне). Он полагал, что «размножение не есть исключительное свойство живых организмов, но является наиболее вероятным способом возникновения в природе всех сложных векториальных систем». Механизм репликации он представлял себе так: «...Пучки длинных молекул растут и размножаются путем продольного расщепления». Далее: «В живых организмах при процессах ассимиляции белка из имеющихся в растворе аминокислот происходит синтез молекул, строго совпадающих с образцами уже имеющихся белковых молекул». И, наконец, говоря о матричном синтезе, он заявляет: «Этот способ — кристаллизация, отложение из окружающего раствора аминокислотных и других ионов на соответствующие места кристаллической решетки, которой является геномная мицелла».

Личность и дела Н.К. Кольцова не нуждаются в восхвалении или возвышенных эпитетах — его исторический вклад известен и однозначен. Однако в связи с юбилейной датой мы еще раз на примере фундаментальной книги ученого убеждаемся в его таланте провидца и умении отстаивать свои воззрения.

СОБЫТИЯ ПЕРВОГО–ВТОРОГО ПОЛУГОДИЯ 2006 ГОДА

Некролог

Памяти академика РАН Л.С. Сандахчиева



29 июня 2006 года после тяжелой болезни скончался вице-президент Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, член редакционного совета журнала «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова» академик РАН Лев Степанович Сандахчиев.

Л.С. Сандахчиев — крупный исследователь в области молекулярной биологии, вирусологии, генной инженерии, эпидемиологии, экологии.

Он создал уникальный научно-производственный комплекс по изучению возбудителей особо опасных вирусных инфекций — ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» (г. Кольцово Новосибирской обл.) — и длительное время руководил данным учреждением. Сформированная им научная школа молекулярной вирусологии является одной из ведущих в мире. Он — автор около 300 научных работ и изобретений. На протяжении 40 лет его имя появлялось в ведущих отечественных и зарубежных журналах, часто в соавторстве с выдающимися молекулярными биологами нашей страны (Д.Г. Кнорре, А.А. Баев, Ю.А. Овчинников, Е.Д. Свердлов, А.Д. Мирзабеков и др.). Его труды посвящены изучению ультрамикрометодов анализа нуклеиновых кислот, биохимии клеточной дифференцировки и ядерно-цитоплазматических отношений, геномным и генно-инженерным исследованиям в вирусологии. Лауреат Государственной премии СССР (1985) за разработку уникальных методов анализа высокомолекулярных соединений, премии

Правительства РФ в области науки и техники (2000). Награжден двумя орденами, медалями.

Л.С. Сандахчиев активно способствовал прогрессу отечественной биотехнологии. Им и его сотрудниками сделано много в области биотехнологии вакцинных препаратов и диагностикумов (вакцины против вирусного гепатита А и наборы для диагностики ВИЧ-инфекции). Им организовано первое в России производство рекомбинантного интерферона.

По инициативе Льва Степановича и под его руководством проводились исследования структурно-функциональной организации вируса натуральной оспы. С 1997 по 2005 г. он являлся руководителем центра ВОЗ по диагностике вирусов и музея штаммов и ДНК вируса натуральной оспы, который был создан на базе ГНЦ ВБ «Вектор».

Его уход из жизни — большая потеря для нашей фундаментальной и прикладной науки.

Вся жизнь ученого является образцом цельности и преданности родной науке — химии. Он родился в 1937 году в Ростове-на-Дону. В 1959 г. окончил Московский химико-технологический институт им. Д.И. Менделеева. По окончании вуза он был распределен в Новосибирский институт органической химии СО АН СССР, где прошел путь от старшего лаборанта до заведующего лабораторией. В 1966 г. защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук, а в 1976 г. — на соискание ученой степени доктора биологических наук. С 1974 г. он начинает работать во вновь созданном Всесоюзном НИИ молекулярной биологии Главмикробиопроба при СМ СССР (будущем НПО-ГНЦ-ФГУ «Вектор»), а с 1979 г. становится его бессменным директором.

В 1981 г. Льву Степановичу присвоено ученое звание профессора, и в этом же году он был избран членом-корреспондентом по Отделению биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений АН СССР, а с 1992 г. стал академиком РАН.

Естественно, исследователь подобного ранга был удостоен высокого научного и общественного признания: он был членом ряда научных советов, входил в состав редколлегии ведущих журналов по профилю его деятельности («Молекулярная биология», «Вопросы вирусологии» и др.).

Более подробно о фактах его биографии и научной деятельности, список его трудов см. на сайте ФГУ «Вектор» www.vector.nsc.ru.

4–5 июля 2006 года в г. Светлогорске Калининградской области состоялась Научно-практическая конференция «Пищевая и морская биотехнология: проблемы и перспективы». Она была организована Правительством Калининградской области, Калининградским государственным техническим университетом и Обществом биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова при поддержке Союза предприятий биотехнологической отрасли.

В работе конференции приняли участие более 80 специалистов в области пищевой и морской биотехнологии, сельского хозяйства, представляющие различные регионы Российской Федерации, Республику Беларусь, Германию. Участников конференции приветствовали представители исполнительных органов Калининградской области.

Главная цель конференции состояла в обсуждении актуальных проблем пищевой и морской биотехнологии, экспертной оценке и определении приоритетов в развитии этих важных областей прикладной биотехнологии.

Участники конференции констатировали, что в стране имеется высокий научный и образовательный потенциал в указанных областях биотехнологии. Открываются возможности промышленного производства с использованием передовых технологий, расширяется международное сотрудничество в этой сфере. Однако назрела потребность в консолидации сил, концентрации на наиболее приоритетных направлениях данной области, особенно в плане морской биотехнологии.

В результате обсуждения научных, методических, организационных и иных аспектов проблем пищевой и морской биотехнологии конференция приняла РЕШЕНИЕ:

1. Считать необходимой разработку специального целевого федерального проекта «Морская биотехнология» в рамках Национальной программы «Развитие биотехнологии в Российской Федерации на 2006–2015 гг.»

2. Организовать рабочую группу для разработки концепции проекта в составе: М.П. Андреев, Т.К. Каленик, Г.В. Маслова, О.Я. Мезенова, А.В. Подкорытова, С.В. Немцев, Т.Н. Пивненко.

3. Образовать в структуре Общества биотехнологов России секцию «Морская биотехнология».

4. Довести материалы и решения конференции до профильных научно-исследовательских институтов, вузов, работников отрасли, СМИ.

5. Очередную конференцию по морской и пищевой биотехнологии провести в Калининграде в 2008 г.

12–13 сентября 2006 года в г. Анапа состоялась Третья научно-практическая конференция «Актуальные вопросы медицинской биотехнологии». Оргкомитет конференции возглавляли академик-секретарь Отделения профилактической медицины РАМН, академик РАМН В.В. Зверев и ректор Кубанского государственного медицинского университета, профессор Б.Г. Ермошенко (Краснодар). В рамках конференции состоялись пленарные заседания, симпозиум по новым методам в медицинской биотехнологии и два круглых стола, один из которых был посвящен презентации новейших отечественных практических разработок в данной области. Были обсуждены также вопросы преподавания иммунологии, микробиологии и вирусологии в медвузах.

20–21 сентября 2006 г. в Москве прошел симпозиум «Биобезопасность микробиологических ресурсов – взаимодополняющая инновация». Симпозиум был организован под эгидой Организации по экономическому сотрудничеству и развитию (The Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD). Непосредственно курировала вопросы проведения симпозиума рабочая группа по биотехнологии OECD. С докладами выступил ряд известных отечественных и зарубежных специалистов в указанной области. Представительность и широта охвата темы дали возможность полностью реализовать целевые установки симпозиума – представить обзор современного состояния проблемы биобезопасности и наметить пути международного сотрудничества.

ПУБЛИКАЦИИ

Phage and the origins of molecular biology. Eds. J. Cairns, G.S. Stent, and J.D. Watson. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006. – 370 p.

Резюме. Юбилейное издание, приуроченное к 40-летию выхода в свет знаменитой книги, впервые опубликованной в 1966 г. и посвященной 60-летию со дня рождения выдающегося физика и биолога Макса Дельбрюка. В оригинальном варианте в ней представлены 35 статей известных молекулярных биологов, в их числе Нобелевские лауреаты Дж. Уотсон, А. Херши, С. Лурья, Дж. Бидл, Р. Дульбекко. Была помещена в сборнике 1966 г. и статья самого юбиляра – перепечатка его классической работы 1949 г. «Взгляд физика на

биологию». Есть в книге и работы других ее редакторов, кроме уже упомянутого Дж. Уотсона. Настоящее издание воспроизводит прежний текст, но включает в себя дополнительно статью английского ученого Сиднея Бреннера (лауреата Нобелевской премии по медицине 2002 г.). Этот исследователь в свое время подготовил данную статью к публикации в издании 1966 г., однако по каким-то причинам это не произошло. В результате С. Бреннер исправил историческую ошибку и поместил вновь написанную статью, в которой приводит свой ретроспективный взгляд на значение «фаговой группы» (М. Дельбрюк, С. Лурия, А. Херши) для развития молекулярной биологии.

Байдалинова Л.С., Лысова А.С., Мезенова О.Я., Сергеева Н.Т., Слуцкая Т.Н., Степанцова Г.Е. Биотехнология морепродуктов. — М.: Мир, 2006. — 560 с.

Аннотация. Приведены биохимическая характеристика гидробионтов как сырья для получения комплексов биологически активных веществ, технологии комбинированных и аналоговых продуктов, обладающих биологической активностью. Даны научные основы процессов в биотехнологии морепродуктов. Охарактеризованы технологические направления получения и применения ключевых биоизделий из органов и тканей гидробионтов — белковых и аналоговых продуктов, препаратов на основе липидов, ферментов и ингибиторов, витаминов и их комплексов, биополимеров-структурообразователей, высокоминерализованных концентратов, комбинированных поликомпонентных композиций. Для студентов и курсантов высших и средних профессиональных учебных заведений, обучающихся по специальностям 260302.65, 260302.51 (2709) Технология рыбы и рыбных продуктов, Пищевая биотехнология, 260602.65 Пищевая инженерия малых предприятий.

Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л. Основы фармацевтической биотехнологии. — М.: Феникс НТЛ, 2006. — 256 с.

Аннотация. По определению ученых всего мира, XXI век будет веком биотехнологий. В сфере производства лекарственных средств биотехнология вытесняет традиционные технологии, открывает принципиально новые возможности. Биотехнологическим способом производят генно-инженерные белки (интерфероны, интерлейкины, инсулин, вакцины против гепатита и т.п.),

ферменты, диагностические средства (тест-системы на наркотики, лекарственные вещества, гормоны и т.п.), витамины, антибиотики, биodeградируемые пластмассы, биосовместимые материалы. В учебном пособии приведены принципы создания и технологические схемы производства фармацевтических продуктов. Предназначено для студентов фармацевтических факультетов медицинских вузов.

Тихонов И.В. Биотехнология. — М.: Гиорд, 2005. — 792 с.

Аннотация. Учебник написан в соответствии с программой курса, утвержденной УМО вузов РФ по образованию в области зоотехнии и ветеринарии. Предусматривает изучение таких разделов, как биосистемы, объекты и методы биотехнологии; субстраты и продукты биотехнологических систем; генетически модифицированные клетки и организмы; технологические стадии производства биопрепаратов; автоматизированный контроль и управление биотехнологическими процессами; санитарные и экологические требования к производству биопрепаратов и др. Предназначен для подготовки студентов по специальностям 310800 — Ветеринария, 310700 — Зоотехния, 012200 — Биофизика, специализации «Ветеринарная биофизика»; 012300 — Биохимия, специализации «Ветеринарная биохимия».

Шредингер Э. Мой взгляд на мир. Пер с нем. — М.: Изд-во Едиториал УРСС, 2005. — 152 с.

Аннотация. Эту книгу называют философским завещанием Эрвина Шредингера. В ней изложено мировоззрение ученого-естественника, который оказал значительное влияние на развитие современной физики. Мы имеем дело с довольно редким случаем, когда один из крупнейших естествоиспытателей углубляется в философские проблемы, не связанные с современным естествознанием. Шредингер ясно показывает, что в современной картине мира унаследованные от прошлого представления и оценки должны быть пересмотрены и приведены в соответствие с новыми данными. Он подвергает также критике и учения западных мыслителей: Эпикура, Спинозы, Шопенгауэра, Геккеля и Бертраана Рассела. В книге обсуждаются преимущественно две темы: реальность внешнего мира и этика. В первом случае автор, опираясь на современные знания, встает на нетрадиционную для русского читателя точку зрения. Во второй же основой обсуждения служат древнеиндийские

представления религиозно-философского характера. Анализируется роль метафизики в естественных науках и ее значение для духовной жизни людей. Проблемы и идеи возникли под влиянием извечного стремления человечества распознать единое за множеством явлений.

Композиционно книга состоит из двух частей, первая из которых представляет собой рукопись, написанную осенью 1925 г. и озаглавленную «Поиски пути», а вторая — более короткий текст, написанный спустя 35 лет, в 1960 г. (после выхода в отставку в возрасте 73 лет) под заглавием «Что действительно?». Представляет особый интерес содержание второй части: 1) Основания для отказа от дуализма мышления и бытия или духа и материи. 2) Мы убеждаемся в общности мира только благодаря языковому взаимопониманию. 3) О несовершенстве взаимопонимания. 4) Учение о тождестве: свет и тени. 5) Два повода к удивлению. Эрзацэтика.

Soto Claudio. Prions: New Biology of Proteins. — Oxford: Oxford Univ. Press, 2005. — 184 p.

Резюме. В книге описываются обусловленные прионами заболевания у человека и животных. Приведена информация о клеточной биологии, генетической и иных функциях прионных белков. Проанализированы механизмы передачи прионных болезней. Обсуждаются вопросы их лечения. Рассматриваются точки приложения знаний о прионах к другим областям медицины и биологии.

Gene Therapy: Prospective Technology Assessment in Its Societal Context. Ed. by J. Niewoehner & C. Tonnert. — Elsevier, 2006. — 274 p.

Резюме. Книга представляет собой итог работы по теме «Обсуждение этических вопросов биомедицины», проведенной в рамках междисциплинарного симпозиума по биоэтике и научным связям, состоявшегося в Медицинском центре имени Макса Дельбрюка, в Берлин-Бухе (Германия). Отличительной особенностью труда является объединение точек зрения различных исследователей, представляющих разные государства и специальности. Основные акценты делаются на анализ биологических и клеточных основ генотерапии, а также на юридические вопросы. В книге изложен взгляд на будущее восприятие генотерапии в Европе.

Wan-Li Xing, Jing Cheng. Frontiers in Biochip Technology. — Springer Verlag New York Inc., 2006. — 366 p.

Резюме. Довольно подробная современная подборка о биочипах. В ней изложены данные о «microarray» технологии и ее применении, разработке лекарственных препаратов, микроструйной технике, биоинформатике, методах детекции, технологии «lab-on-chip». Книга адресована биотехнологам разного профиля: специалистам в области генной инженерии, фармакологам и т.д.

Nanotechnology Challenges. Implications for Philosophy, Ethics and Society. J. Schummer & D. Baird (eds.). — World Scientific Publishing, 2006. — 468 p.

Резюме. Нанотехнология как бурно развивающаяся область знаний привлекает к себе внимание не только ученых и инженеров, но и представителей гуманитарных специальностей: философов, социологов и др. В книге собраны статьи, освещающие философские, этические и социологические аспекты нанотехнологии. Авторы — крупные исследователи из Северной Америки и Европы.

The Biomedical Engineering Handbook. J.D. Bronzino (ed.). 3rd ed. — CRS Press, 2006. — 4232 p.

Резюме. Третье издание известного объемистого руководства по биомедицинской инженерии, которое специалисты данного профиля называли «Библией». Оно вышло в 3 томах (второе издание 2000 г. — в 2 томах). По сравнению с предыдущими изданиями оно включает в себя новый раздел по бионанотехнологии.

Protein Design: Methods and Applications. R. Guerois, M. Lopez de la Paz (ed.). — Humana Press Inc., 2006. — 288 p.

Резюме. В книге, состоящей из более десятка статей разных авторов, рассматриваются структурные модели белка. Обсуждаются методические вопросы, проблемы конформации и белковой инженерии и т.д.

Biotech in Personal Care. Raj Lad (ed.). — Marcel Dekker Ltd., 2006. — 480 p.

Резюме. Книга состоит из трех частей, в которых последовательно проанализированы достижения биотехнологии, вопросы практического применения и перспективы. Значение биотехнологии для личной гигиены освещается в следующих аспектах: уход за кожей, борьба с облысением, производство предметов ухода за полостью рта.

Nil K.R. Glossary of Biotechnology and Nanobiotechnology Terms. 4th ed. — Taylor and Francis Books, CRS Press, 2005. — 416 p.

Резюме. Четвертое издание словаря терминов по биотехнологии и нанобиотехнологии. Книга адресована начинающим специалистам в указанных областях или исследователям из других научных направлений. Особенно важно прибавление к устоявшемуся перечню биотехнологических понятий терминов по нанотехнологиям, связанных с биотехнологией.

Text Mining for Biology and Biomedicine. S. Ananiadou, J. McNaught (eds.). — Artech House Books, London, 2006. — 302 p.

Резюме. Книга предназначена для специалистов в области биоинформатики. В ней представлены современные методы автоматической обработки биомедицинских терминов. Привлекаются различные подходы, включая лексические, семантические, онтологические, кластерный анализ и др.

Genes in Development: Re-Reading the Molecular Paradigm. E. Neumann-Held & Ch. Rehmann-Sutter. — Duke Univ. Press, Durham, 2006. — 408 p.

Резюме. Сборник статей 15 авторов, которые подобраны по следующему принципу. Авторы, не отрицающие идею о важности ДНК в жизненных процессах, не солидарны с преобладающей парадигмой, что только ДНК ответственна за программирование жизни. Свою аргументацию исследователи выстраивают в историческом, гносеологическом, теоретическом, социальном и этическом аспектах. Причем, некоторые авторы (Sahotra Sarkar) даже подвергают сомнению эффективность проекта «Геном человека».

The Bacteriophages. R.L. Calendar, S.T. Abadon (eds.). 2nd ed. — Oxford Univ. Press, 2006. — 760 p.

Резюме. В руководстве освещены фундаментальные и практические основы современных знаний о бактериофагах. Описаны типы бактериофагов, связанные с главными классами эубактерий и архей.

Nanotechnology: Risk, Ethics and Law. G. Hunt & M. Mehta (eds.). — Earthscan Publications Ltd., 2006. — 296 p.

Резюме. Среди авторов книги такие известные специалисты, как Roland Clift, K. Eric Drexler, Arpad Pusztai. В ней рассмотрены вопросы взаимодействия нанотехнологий и общества на примере Европы, США, Канады, Японии. Проанализированы проблемы этики, риска воздействия на окружающую среду и здоровье человека. В связи обсуждены аспекты правового регулирования нанотехнологий.

Sunder Rajan K. Biocapital: The Constitution of Post-genomic Life. — Duke Univ. Press, 2006. — 360 p.

Резюме. Тема книги — экономические аспекты биотехнологии. Автор провел сравнительный анализ деятельности биотехнологических лабораторий и малых предприятий в США (Сан-Франциско) и Индии (Нью Дели, Хайдарабад и Бомбей) за 5-летний период (1999–2004 гг.). Акцент делался на развитие рынка лекарств в обеих странах. В результате общения с учеными, предпринимателями, владельцами венчурного капитала, высокопоставленными должностными лицами он продемонстрировал целевые установки, финансовые механизмы, способы государственного регулирования, рекламу и маркетинг, действующие в сфере биотехнологии. Кроме того, им рассмотрены этнографические и социологические аспекты, возникающие на стыке биотехнологии и рынка.

Animals with Novel Genes. N. MacLean (ed.). — Cambridge Univ. Press, 2006. — 280 p.

Резюме. В книге освещается проблема трансгенных животных. В ней 7 глав, написанных разными авторами: 1) Трансгенные животные в перспективе. 2) Трансгенные насекомые. 3) Трансгенные рыбы. 4) Трансгенные птицы. 5) Трансгенные грызуны. 6) Крупные трансгенные млекопитающие. 7) Малые трансгенные системы.

Biorefineries — Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions. 2 Volumes. Birgit Kamm, Patrick R. Gruber, Michael Kamm (eds.). — Wiley-VCH, 2006. — 960 p.

Резюме. Это — первая книга, посвященная промышленным методам биоочистки. В ней рассматриваются технологические процессы, производственные линии, теоретические и экономические вопросы. В основе лежат достижения «зеленой» химии. Обсуждены также инженерно-технические особенности технологий биоочистки.

ПРЕДСТОЯЩИЕ МЕРОПРИЯТИЯ 2006 ГОДА

КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ

25–27 октября 2006 г. в Москве и Пушкино состоится VIII чтения, посвященные памяти академика Ю.А. Овчинникова. Организаторы: Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Научный совет по биоорганической химии. Справки: E-mail: ovch@ibch.ru.

6–7 декабря 2006 г. в Пушкино состоится Четвертый съезд Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Справки: 8 (915) 179-51-92. E-mail: obr@biorosinfo.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 рубрикаций, 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 России.

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 55 регионах России и объединяет свыше 2000 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.

Основой организационной деятельности 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