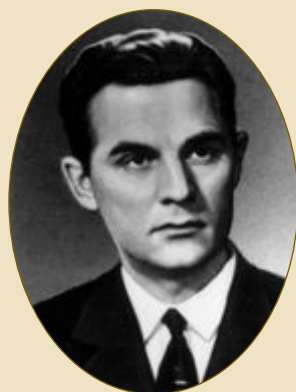


· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

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

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

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



Т. 7, № 2
2011

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРДТ ·

2011, Т. 7, № 2

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василев

Редакционная коллегия

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

Редакционный совет

В.А. Быков (Москва), В.Г. Дебабов (Москва), С.Х. Дегтярев (Новосибирск),
В.В. Зверев (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), А.Н. Панин (Москва),
В.О. Попов (Москва), К.Г. Скрябин (Москва), 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: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13, 662-95-91

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.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@biorosinfo.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

ISSN 1996-4741

© Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем, 2011.

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Василев* 4

Оригинальные статьи

Биокаталитический синтез акриловой кислоты клетками *Pseudomonas fluorescens* C2,
иммобилизованными на каолине.

Ю.Г. Максимова, В.А. Демаков, Г.В. Овечкина 5

Сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза *FaiI* узнает вырожденную четырехнуклеотидную
последовательность 5'-YA[^]TR-3'.

Ю.Э. Томилова, В.А. Чернухин, С.Х. Дегтярев 11

Микробный биосенсор как инструмент биотестирования: оценка токсичности
товаров народного потребления.

*О.Н. Понаморева, И.Ф. Чепкова, М.А. Ануфриев, В.А. Алферов,
В.А. Щеглова, Е.Н. Музафаров* 17

Применение первичных культур нервных и глиальных клеток млекопитающих для отбора соединений
с нейропротекторной активностью.

*И.А. Гривенников, О.В. Долотов, Л.С. Иноземцева, С.А. Антонов,
А.Г. Кобылянский, Н.Ф. Мясоедов* 24

Влияние ионогенных полисахаридов на активность целлюлолитических и амилолитических ферментов.

Д.В. Тарабукин, М.А. Торлопов, В.В. Володин 32

Получение биологически активного фукоидана и альгината кальция из бурых водорослей.

Л.Х. Вафина 39

Краткие сообщения

Получение нового образца функционального диетического питания и изучение
проявляемой им антибактериальной активности.

Ю.С. Дунаевская, О.В. Лукин, Н.М. Шустрова, С.О. Лукин 47

Обзоры

Экдистероидсодержащие растения — источники новых адаптогенов.

В.В. Володин, С.И. Матаев 52

Красные водоросли — перспективное сырье для пищевой и морской биотехнологии.

И.А. Кадникова 60

Страницы истории

К 100-летию со дня рождения выдающегося иммунолога Нильса Йерне.

О.В. Воробьева 63

Хроника

События первой половины 2011 года 73

Правила для авторов 79

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

Biocatalytic synthesis of acrylic acid by cells *Pseudomonas fluorescens* C2,
immobilized on the kaolin.

Ju.G. Maximova, V.A. Demakov, G.V. Ovechkina..... 5

Site-specific DNA endonuclease *FaiI* recognizes degenerate four-nucleotide
sequence 5'-YA[^]TR-3'.

Ju.E. Tomilova, V.A. Chernukhin, S.Kh. Degtyarev 11

Microbial biosensor as a tool for bioassay: assessment of the toxicity
of consumer goods.

*O.N. Ponamoreva, I.F. Chepkova, M.A. Anufriev, V.A. Alferov,
V.A. Scheglova, E.N. Muzafarov* 17

Using of neuronal and glial primary cell cultures of mammals for screening of the compounds
on neuroprotective activity.

*I.A. Grivennikov, O.V. Dolotov, L.S. Inozemtseva, S.A. Antonov,
A.G. Kobylanski, N.F. Myasoedov*..... 24

Effect of ionogenic polysaccharides on the activity of cellulolytic and amylolytic enzymes.

D.V. Tarabukin, M.A. Torlopov, V.V. Volodin 32

Production of biologically active fucoidan and calcium alginate from brown algae.

L.H. Vafina 39

Short communications

Development a new type of functional dietary food and the study
of its exhibited antibacterial activity.

Yu.S. Dunaevskaya, O.V. Lukin, N.M. Shustrova, S.O. Lukin 47

Reviews

Ecdysteroid containing plants – sources of new adaptogens.
V.V. Volodin, S.I. Mataev..... 52

Red algae – a promising raw material for food and marine biotechnology.

I.A. Kadnikova 60

Pages of history

On the 100th anniversary of the birth of the prominent immunologist Niels Jerne.
O.V. Vorobyeva..... 63

The chronicle

Events of the first half-year 2011 73

Rules for authors 79

К читателям

Во втором номере журнала за 2011 год сделана, на мой взгляд, очень удачная подборка оригинальных статей по разным направлениям биотехнологии и молекулярной биологии.

В работе Ю.Г. Максимовой с коллегами из Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (Пермь) осуществлено исследование путей оптимизации каталитического синтеза акриловой кислоты псевдомонадами.

Группа новосибирских авторов (Томилова Ю.Э. и др.) в продолжение своей серии исследований привела результаты изучения субстратной специфичности новой сайт-специфической ДНК-эндонуклеазы FaiI.

Коллектив пушчинских и тульских исследователей уже давно и целеустремленно разрабатывает теоретические и практические аспекты применения биосенсоров. На этот раз они представили ценные факты о возможностях метода экспресс-оценки токсичности товаров народного потребления из полимерных и текстильных материалов с помощью биосенсора на основе кислородного электрода с иммобилизованными микроорганизмами.

Хорошо продумана и выполнена работа учеными из Института молекулярной генетики РАН (Гривенников И.А. и др.): они нашли эффективную модель для тестирования *in vitro* нейропротекторного действия препаратов-кандидатов, на которой они осуществляют соответствующий скрининг.

Сотрудники Института биологии Коми научного центра УрО РАН (Тарабукин Д.В. и др.) систематически изучают эффекты ионогенных полисахаридов на активность целлюлолитических и амилолитических ферментов и делятся своими последними данными, добытыми по этой проблеме.

Вафиной Л.Х. (ВНИРО, Москва) освещен вопрос о перспективах развития отечественной морской биотехнологии, в частности о методах извлечения фукоидана и альгината кальция из бурых водорослей и в целом о важности этого объекта для получения полисахаридов, маннита, БАВ, производства биотоплива.

Весьма полезный обзор о поиске новых адаптогенов из экдистероидсодержащих растений подготовили профессор В.В. Володин (Сыктывкар) и С.И. Матаев (Тюмень).

Помещается также ряд кратких статей по актуальным направлениям биотехнологии (Дунаевская Ю.С. и др., Кадникова И.А.).

В рубрике «Хроника» публикуются рекомендации состоявшегося в июне 2011 г. круглого стола в Государственной Думе ФС РФ, посвященного сохранению биологических коллекций и развитию биоресурсных центров в нашей стране.

Наконец, в историческом разделе даны материалы к 100-летию со дня рождения выдающегося иммунолога, лауреата Нобелевской премии Нильса Йерне.

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

БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ АКРИЛОВОЙ КИСЛОТЫ КЛЕТКАМИ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* C2, ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ НА КАОЛИНЕ

Ю.Г. МАКСИМОВА^{1*}, В.А. ДЕМАКОВ^{1,2}, Г.В. ОВЕЧКИНА¹

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН,

² ГОУ ВПО «Пермский государственный университет», Пермь

Клетки бактерий *Pseudomonas fluorescens* C2, адсорбционно иммобилизованные на каолине, катализировали реакцию гидролиза нитрила акриловой кислоты до акриловой кислоты. Показано, что клетки псевдомонад данного штамма, обладающие гидрофильной поверхностью, эффективно адсорбировались на гидрофильном каолине (до 47 мг сухих клеток на 1 г носителя). Нитрилазная активность иммобилизованных клеток не снижалась по сравнению с таковой суспендированных клеток, а при концентрации акрилонитрила 1,3 М достоверно превышала ее. Время работы иммобилизованного биокатализатора достигало 288 ч, а общая продуктивность составляла 1143 ммоль акриловой кислоты на 1 мг клеток. Достоверного различия температурной зависимости активности у свободных и иммобилизованных клеток не наблюдалось.

Ключевые слова: нитрилаза, нитрил акриловой кислоты, акриловая кислота, каолин, *Pseudomonas fluorescens*.

Акриловая кислота (АК), широко используемая в промышленности для производства полимеров и сополимеров различного назначения, в частности, лаков, красок, пластических масс, моющих средств, может быть получена путем ферментативного гидролиза нитрила акриловой кислоты (НАК). Известны два пути гидролиза нитрилов: двустадийный нитрилгидратазный путь, включающий стадию гидратации нитрила до соответствующего амида с помощью фермента нитрилгидратазы (КФ 4.2.1.84), и стадию гидролиза амида до карбоновой кислоты, осуществляемую амидазой (КФ 3.5.1.4). Одностадийный путь прямого гидролиза нитрила в соответствующую карбоновую кислоту катализируется ферментом нитрилазой (КФ 3.5.5.1) [8, 10]. Тем не менее, по современным данным, даже при гидролизе нитрилазой образуется некоторое количество побочного продукта — амида [9].

Компания «Биоамид» (Саратов) биотехнологическим способом производит акрилат аммония на основе

нитрилазного штамма *Alcaligenes denitrificans* C-32. Путем направленной селекции сотрудниками ЗАО «Биоамид» и ФГУП ГосНИИгенетика (Москва) получен штамм *A. denitrificans* ВКПМ В-9582 с более высокой нитрилазной активностью [1]. В настоящей работе использован штамм *Pseudomonas fluorescens* C2, содержащий нитрилазу, который был селекционирован в лаборатории химического мутагенеза Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (Пермь).

Иммобилизация клеток микроорганизмов, используемых в хемоэнзиматическом синтезе, имеет ряд преимуществ, которые позволяют интенсифицировать биотехнологический процесс. Стабилизация ферментативной активности, возможность разработки непрерывных технологий, снижение количества отходов в виде отработанной биомассы — далеко не полный перечень положительных моментов гетерогенного биокатализа. Адсорбция клеток интересна тем, что бактерии возвращаются в свое естественное прикрепленное состояние, изучение которого позволяет приблизиться к пониманию процессов, происходящих в природе.

Экспериментальную адгезию микроорганизмов к нерастворимому носителю можно рассматривать как модель первого этапа образования биопленки в природе, связанного с прикреплением клеток к биотической или абиотической поверхности [2]. Кроме того, этот метод иммобилизации бактерий прост и доступен, при

© 2011 г. Максимова Ю.Г., Демаков В.А., Овечкина Г.В.

* Автор для переписки:

Максимова Юлия Геннадьевна

к.б.н., научный сотрудник лаборатории химического мутагенеза

Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН,

614081 Пермь, ул. Голева, 13

Тел.: (342) 212-44-76; факс: (342) 280-92-11

E-mail: maks@iegm.ru

его реализации отсутствуют факторы, повреждающие клетки и ингибирующие ферментативную активность, не затрудняется массообмен. Ранее авторами был изучен процесс гидролиза акрилонитрила клетками *P. fluorescens* C2, адсорбированными на углеродных волокнистых материалах [6]. Согласно данным, полученным нами ранее, клетки этого штамма псевдомонад имеют гидрофильную поверхность, поэтому можно предположить лучшее сродство клеток к гидрофильному, а не гидрофобному носителю, в частности, к каолину.

Каолин является высокодисперсной пластичной породой, состоящей в основном из минерала каолинита — гидросиликата алюминия. Она представляет собой мелкие гидрофильные частицы пластинчатого строения с толщиной пластинок 0,1–3,0 мкм [4].

Описаны факты стимулирования физиологической активности микроорганизмов высокодисперсными материалами. Так, например, высокодисперсный диоксид кремния и его модифицированные формы в большинстве случаев стимулировали рост агробактерий, более выраженное стимулирующее влияние на рост азотфиксирующих и фосфатмобилизующих бактерий оказывали природные материалы монтмориллонит и палыгорскит [3, 4]. M.J. Vieira и L.F. Melo показали, что биопленки *Pseudomonas fluorescens*, формируемые при смешивании бактериальной суспензии с частицами каолина, по сравнению с биопленками без частиц каолина, обладают большей стабильностью и респираторной активностью, связанной с изменением в их физической структуре [13].

Использование биопленок микроорганизмов, развивающихся на частицах глин, в частности, каолина, для удаления ионов тяжелых металлов из водных систем позволяет эффективно скомбинировать сорбционные свойства глин и микроорганизмов [11]. Однако в научной литературе практически не содержится сведений о биокаталитических технологиях, связанных с применением микроорганизмов, иммобилизованных на каолине. Учитывая сорбционные свойства каолина, а также его доступность, относительно низкую стоимость, химическую устойчивость и биосовместимость, представляется возможным создание иммобилизованного биокатализатора на основе адгезированных к каолину каталитически активных бактериальных клеток.

Цель настоящей работы заключалась в изучении свойств (активности и стабильности) иммобилизованного биокатализатора гидролиза нитрила акриловой кислоты на основе клеток *P. fluorescens* C2, адсорбированных на каолине.

Материалы и методы

Клетки *Pseudomonas fluorescens* C2 выращивали на синтетической среде N следующего состава (г/л): глюкоза — 1,0; ацетонитрил — 3,9; KH_2PO_4 — 1,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 1,6; NaCl — 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; CaCl_2 — 0,005; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,01; pH 7,4 при 30 °C на качалке со скоростью перемешивания 100 об./мин.

Рост культуры оценивали по изменению оптической плотности клеточной суспензии при $\lambda = 540$ нм, измеренной на фотоэлектроколориметре КФК-3 с использованием кюветы толщиной 0,5 см. Единица ОП540 для штамма *P. fluorescens* C2 соответствует 0,21 мг сухих клеток в 1 мл суспензии.

Адсорбционную иммобилизацию выращенной до стационарной фазы роста культуры *P. fluorescens* C2 проводили в течение 20 ч, 1 ч с перемешиванием на качалке со скоростью 120 об./мин., затем в стационарных условиях при 22–24 °C. В качестве носителя использовали каолин (Merck, Германия), весовое соотношение носитель : суспензия бактерий составляло 1 : 10.

Трансформацию НАК иммобилизованными клетками проводили в 10 мл калий-фосфатного буфера (pH 7,2±0,2) при 25 °C. В реакционную среду вносили субстрат в концентрации от 0,09 до 1,3 М, реакцию проводили в течение 40 мин. и останавливали добавлением концентрированной HCl до конечной концентрации 2%.

Нитрилазную активность определяли по увеличению концентрации карбоновой кислоты в реакционной среде. Концентрацию акриловой кислоты определяли методом ВЭЖХ на хроматографе LC-10 «Shimadzu» (Япония) с диодно-матричным УФ- и флуоресцентным детектором и колонкой Synergi 4u Hydro-RP 80A (250×4,6 мм), заполненной силикагелем (фракция 4 мкм). В качестве подвижной фазы использовали раствор 25 мМ NaH_2PO_4 , скорость потока составляла 0,5 мл/мин. при температуре 25 °C.

Удельную ферментативную активность определяли как количество акриловой кислоты в мкмольях, образуемое за 1 мин. биомассой бактерий, соответствующей 1 мг сухих клеток.

Операционную стабильность биокатализаторов на основе адсорбированных клеток *P. fluorescens* C2 оценивали по сохранению нитрилазной активности при последовательном проведении реакции трансформации НАК, вносимого в каждом цикле до концентрации 1,3 М. Продолжительность одного цикла реакции составила 24 ч. После проведения реакционного цикла

биокатализаторы отмывали 0,01 М калий-фосфатным буфером.

Чтобы изучить влияние температуры на скорость протекания конверсии акрилонитрила в акриловую кислоту, проводили реакцию трансформации 1,3 М раствора акрилонитрила в 10 мл 0,01 М калий-фосфатного буфера (рН $7,2 \pm 0,2$) в течение 40 мин. при температурах 21, 30, 40, 50, 60 °С с предварительным нагревом в течение 10 мин. в термостате ТС-1/80 СПУ (Россия). Реакцию катализировали иммобилизованными и адсорбированными клетками *P. fluorescens* С2.

Результаты представлены средними значениями, полученными в трех независимых опытах. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали компьютерную программу Microsoft Excel 2003, рассчитывая среднее арифметическое значение, доверительные интервалы и стандартное отклонение. Статистическую значимость результатов определяли при помощи t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Псевдомонады, выращенные до максимальной плотности суспензии и наибольшей нитрилазной актив-

ности, которая наблюдается в стационарной фазе роста, адсорбировали на каолине, как описано ранее. Показано, что график зависимости величины адсорбции клеток *P. fluorescens* С2 от начальной концентрации клеток в суспензии близок к линейному. При концентрации клеток в суспензии 3 мг/мл (по сухой биомассе) величина адсорбции достигает 47 мг сухих клеток на 1 г носителя (рис. 1). Ярко выраженная способность клеток бактерий данного штамма к адгезии на каолине, возможно, связана с высокой дисперсностью материала и сродством гидрофильных поверхностей клеток и носителя. Действительно, движущей силой адсорбционного процесса микроорганизмов на низкоэнергетических незаряженных поверхностях являются гидрофобные взаимодействия [7].

Изучено влияние концентрации субстрата на нитрилазную активность клеток псевдомонад, адсорбированных на каолине. Активность иммобилизованных клеток достоверно превышала активность свободных клеток лишь при концентрации субстрата 1,3 М (рис. 2), что свидетельствует о незначительном влиянии адсорбции на нитрилазную активность. Адсорбция на высокодисперсном непористом материале не приводит к ограничению массообмена, что отражается в сохранении исходной активности клеток.

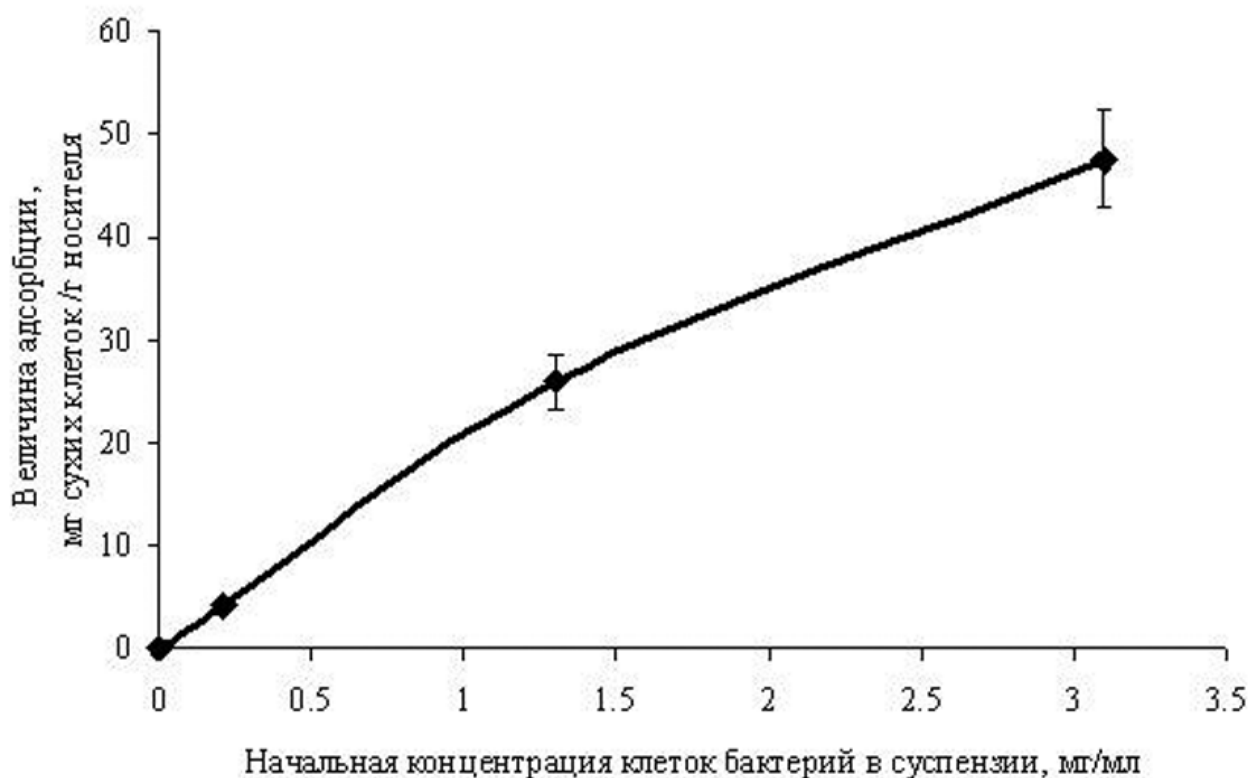


Рис. 1. Влияние концентрации клеток штамма *P. fluorescens* С2 на величину их адсорбции на каолине

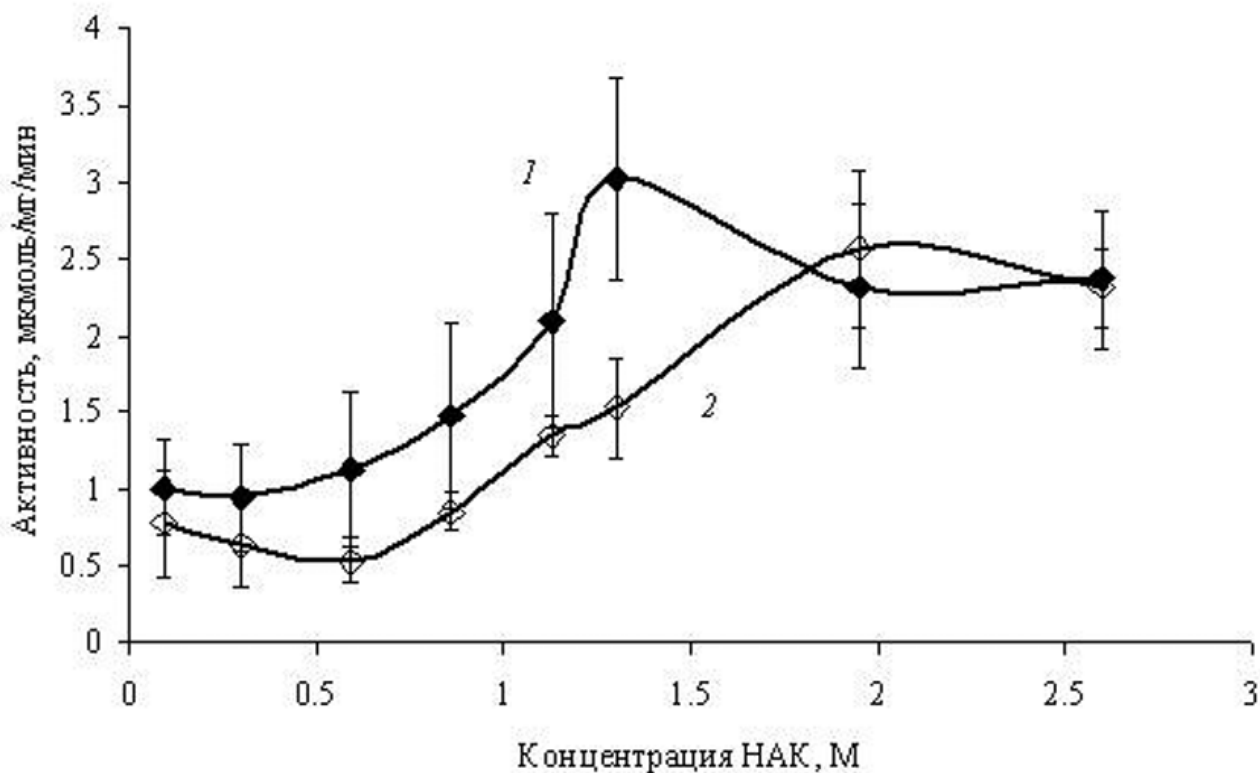


Рис. 2. Активность нитриказы адсорбированных (1) и свободных (2) клеток штамма *P. fluorescens* C2

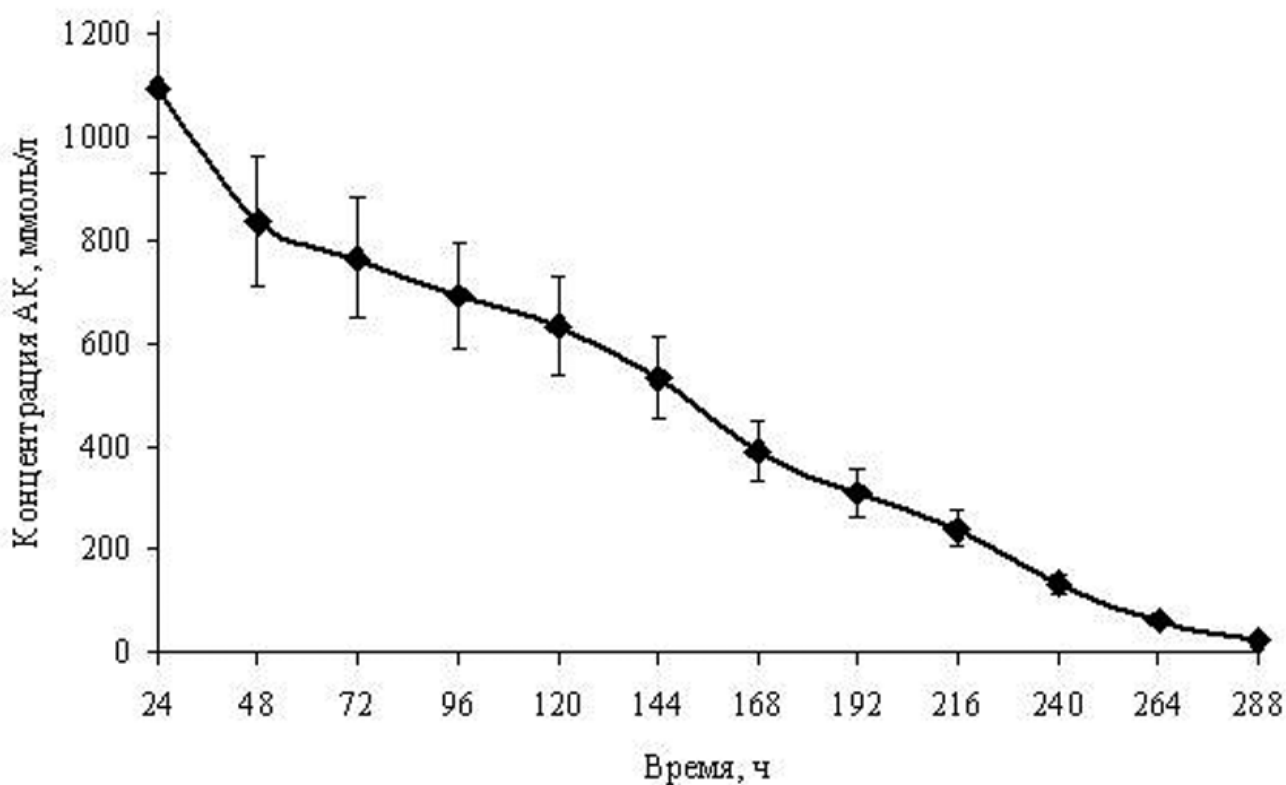


Рис. 3. Операционная стабильность иммобилизованного биокатализатора

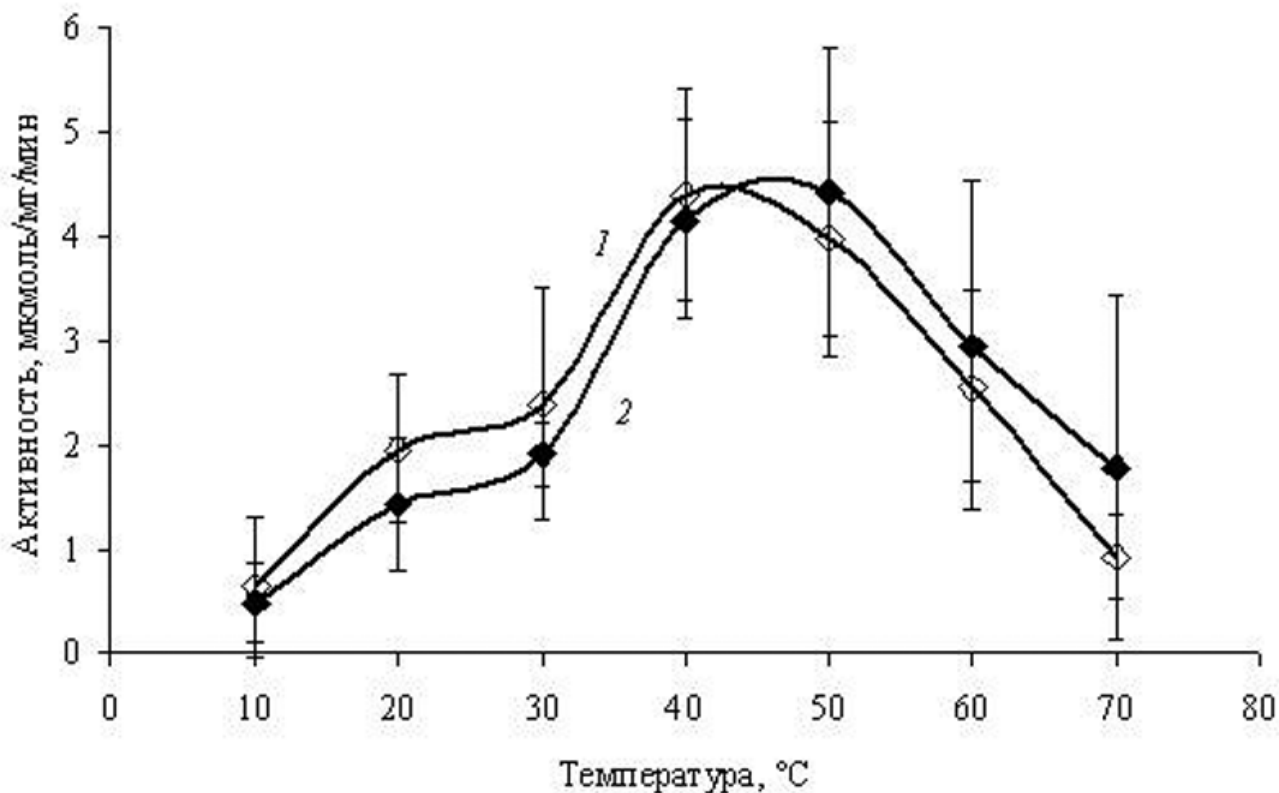


Рис. 4. Влияние температуры на активность нитрилазы свободных (1) и адсорбированных (2) клеток *P. fluorescens* C2

Ранее нами был отмечен факт повышения нитрилгидратазной и нитрилазной активности иммобилизованных клеток [5, 6], который может быть связан с изменениями в работе транспортных систем клетки при ее адгезии к нерастворимому носителю [12].

Определена операционная стабильность биокатализатора на основе иммобилизованных клеток *P. fluorescens* C2 (рис. 3). Показано, что время работы биокатализатора достигает 288 ч, общая продуктивность составляет 1143 ммоль акриловой кислоты на 1 мг клеток. Время полужизни составляет 144 ч, что соответствует шести последовательным 24-часовым циклам реакции. Постепенное снижение количества образуемой кислоты связано главным образом не с вымыванием клеток из реакционной среды либо их разрушением, сопровождающимся выходом нитрилазы в среду, а с ингибированием фермента при воздействии высоких концентраций токсичного субстрата. Это подтверждается отсутствием нитрилазной активности в промыве после проведения реакции.

Изучено влияние температуры на скорость протекания конверсии акрилонитрила в акриловую кислоту (рис. 4). Максимальная активность нитрилазы про-

являлась в диапазоне температур от 40 до 50 °C, причем достоверного различия температурной зависимости активности у свободных и иммобилизованных клеток не наблюдалось. При температуре 70 °C средняя нитрилазная активность адсорбированных клеток выше, чем суспендированных, что в некоторой степени может быть связано с защитным действием носителя. Значительный разброс абсолютных величин ферментативной активности связан со спецификой биологического объекта.

Заключение

Таким образом, иммобилизованный биокатализатор на основе клеток *P. fluorescens* C2, адсорбированных на каолине, эффективно трансформирует акрилонитрил в акриловую кислоту, сохраняя активность суспендированных клеток. Адгезия клеток бактерий обусловлена гидрофильно-гидрофобными свойствами поверхностей клетки и носителя. Величина адсорбции клеток данного штамма псевдомонад, обладающих гидрофильной поверхностью, достигает 47 мг сухих клеток на 1 г каолина, что значительно превышает определенную нами ранее максимальную величину адсорбции данного штамма на

гидрофобных углеродных носителях (6 мг сухих клеток на 1 г носителя) [6]. Адсорбция на каолине не приводит к значительному изменению температурной зависимости нитрильной реакции, но дает возможность разработки непрерывных биокаталитических технологий на основе иммобилизованного биокатализатора гидролиза нитрилов.

Литература

1. Глинский С.А., Козулин С.В., Козулина Т.Н., Полтавская С.В., Яненко А.С., Леонова Т.Е. Сравнительный анализ штаммов, используемых в процессе получения акрилата аммония // Биотехнология. — 2010. — № 1. — С. 17–24.
2. Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития // Генетика. — 2004. — Т. 40. — № 11. — С. 1445–1456.
3. Курдиш И.К., Бега Э.Т. Влияние глинистых минералов на рост фосфатмобилизующих бактерий *Bacillus subtilis* // Прикладная биохимия и микробиология. — 2006. — Т. 42. — № 2. — С. 438–442.
4. Курдиш И.К., Титова Л.В. Применение высокодисперсных материалов в технологии культивирования и получения гранулированных препаратов *Agrobacterium radiobacter* // Прикладная биохимия и микробиология. — 2001. — Т. 37. — № 3. — С. 369–373.
5. Максимова Ю.Г., Коваленко Г.А., Максимов А.Ю., Демаков В.А., Чуенко Т.В., Рудина Н.А. Иммобилизованные нерастущие клетки *Rhodococcus ruber* как гетерогенные биокатализаторы для процесса гидратации акрилонитрила в акриламид // Катализ в промышленности. — 2008. — № 1. — С. 44–50.
6. Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю., Демаков В.А., Козлов С.В., Овечкина Г.В., Олонцев В.Ф. Гидролиз акрилонитрила клетками нитрилконвертирующих бактерий, иммобилизованными на волокнистых углеродных адсорбентах // Биотехнология. — 2010. — № 4. — С. 51–58.
7. Федорович В.В., Калужный С.В., Ван дер Мирен П., Верстрает В. Разработка феноменологической модели кинетики бактериальной адсорбции на низкоэнергетических поверхностях // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. — 2002. — Т. 43. — № 6. — С. 417–419.
8. Kobayashi M., Shimizu S. Nitrile hydrolases // Current Opinion in Chemical Biology. — 2000. — Vol. 4. — P. 95–102.
9. Martinkova L., Kren V. Biotransformations with nitrilases // Current Opinion in Chemical Biology. — 2010. — Vol. 14. — P. 130–137.
10. Nagasawa T., Yamada H. Application of nitrile-converting enzymes for the production of useful compounds // Pure & Appl. Chem. — 1990. — Vol. 62. — N 7. — P. 1441–1444.
11. Quintelas C., Rocha Z., Silva B., Fonseca B., Figueiredo H., Tavares T. Removal of Cd(II), Cr(VI), Fe(III) and Ni(II) from aqueous solutions by an *E. coli* biofilm supported on kaolin // Chemical Engineering Journal. — 2009. — Vol. 149. — P. 319–324.
12. Verbelen P.J., De Schutter D.P., Delvaux F., Verstrepen K.J., Delvaux F.R. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications // Biotechnol. Lett. — 2006. — Vol. 28. — P. 1515–1525.
13. Vieira M.J., Melo L.F. Effect of clay particles on the behaviour of biofilms formed by *Pseudomonas fluorescens* // Water Science and Technology. — 1995. — Vol. 32. — N 8. — P. 45–52.

BIOCATALYTIC SYNTHESIS OF ACRYLIC ACID BY CELLS PSEUDOMONAS FLUORESCENS C2, IMMOBILIZED ON THE KAOLIN

Ju.G. MAXIMOVA¹, V.A. DEMAКOV^{1,2}, G.V. OVECHKINA¹

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Division RAS,

² Perm State University, Perm

Pseudomonas fluorescens C2 cells being immobilized on kaolin catalyzed hydrolysis of acrylonitrile to acrylic acid. It has been shown that *Pseudomonas* cells of present strain having hydrophilic surface adsorbed effectively on hydrophilic kaolin (to 47 mg of dry cells on 1 g of support). Nitrilase activity of immobilized cells did not decrease in compare of the same of suspended cells and under concentration of acrylonitrile 1,3 M exceeded its authentically. It has been shown that operation time of immobilized biocatalyst amounts to 288 h, overall production averaged 1143 mM of acrylic acid to 1 mg of cells. Authentic difference of temperature dependence of free and immobilized cells activity was not observed.

Keywords: nitrilase, acrylonitrile, acrylic acid, kaolin, *Pseudomonas fluorescens*.

САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ДНК-ЭНДУКЛЕАЗА *FaiI* УЗНАЕТ ВЫРОЖДЕННУЮ ЧЕТЫРЕХНУКЛЕОТИДНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ 5'-YA[^]TR-3'

Ю.Э. ТОМИЛОВА*, В.А. ЧЕРНУХИН, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Изучена субстратная специфичность новой сайт-специфической ДНК-эндонуклеазы *FaiI*, которая узнает и расщепляет последовательность 5'-YA[^]TR-3', а также гидролизует с меньшей активностью сайт 5'-YA[^]TU. При замене в последовательности узнавания одного из центральных АТ нуклеотидов фермент проявляет никазную активность, причем расщепляется та цепь сайта узнавания, в которой сохраняется тимин. *FaiI* расщепляет ДНК, содержащую в сайте узнавания 5-метилцитозин, N4-метилцитозин и N6-метиладенин.

Ключевые слова: сайт-специфическая эндонуклеаза, вырожденная последовательность узнавания, мелко расщепляющая эндонуклеаза.

Введение

Наиболее изученной группой сайт-специфических ДНК-эндонуклеаз являются эндонуклеазы рестрикции II типа, которые узнают последовательность ДНК длиной 4–8 п.н. и требуют в качестве кофактора только ионы Mg²⁺ [5]. Некоторые из узнаваемых последовательностей рестриктаз представляют собой вырожденные сайты, то есть соответствующий фермент узнает сразу несколько последовательностей. Например, сайтом узнавания рестриктазы *AcsI* является последовательность RAATGY, которая включает в себя сайты AAATTT, GAATTT, AAATTC и GAATTC [2].

Как правило, все такие сайты расщепляются ферментом с одинаковой эффективностью и полностью, а картина гидролиза ДНК соответствует последовательному расщеплению субстратной ДНК по всем отдельным сайтам. Часть эндонуклеаз рестрикции при неоптимальных условиях реакции способны расщеплять неканонические последовательности узнавания, проявляя неспецифическую активность, так называемую *star activity* [1]. Это явление характерно для хорошо известных рестриктаз *EcoRI* [6], *BamHI* [3] и ряда других ферментов [4].

В данной работе представлена новая сайт-специфическая эндонуклеаза *FaiI* из *Flavobacterium*

aquatile B15, которая расщепляет вырожденную четырехнуклеотидную последовательность 5'-YA[^]TR-3', однако при тех же условиях реакции расщепляет и другие последовательности ДНК с меньшей активностью. То есть, фермент *FaiI*, по сравнению с обычными рестриктазами, имеет более высокий уровень неспецифической активности, которая к тому же проявляется в рекомендуемых условиях реакции.

Материалы и методы

В работе использовали следующие реактивы: акриламид, бис-акриламид («Хеликон», Россия), агароза («Hybaid-AGS», Германия), ЭДТА («Fluka AG», Швейцария), Tris («Promega», США), буферные растворы, ферменты, препараты ДНК, маркер молекулярных масс ДНК и олигонуклеотиды производства ООО «СибЭнзим».

Гидролиз ДНК эндонуклеазой *FaiI*. Плазмидную ДНК в количестве 1 мкг расщепляли в объеме 20 мкл в SE-буфере В (10 mM Tris HCl pH 7,9 – при 25 °С, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) при 50 °С. Продукты гидролиза плазмидной ДНК разделяли электрофорезом в 15% ПААГ в Трис-ацетатном буфере. После окрашивания в растворе бромистого этидия фотографировали в УФ свете.

Гидролиз олигонуклеотидов эндонуклеазой *FaiI*. В качестве субстратов для эндонуклеазы *FaiI* в экспериментах использованы олигонуклеотидные дуплексы следующего состава:

1	5'-CGAGTTC CAT GGCTGGGCCCCAAC-3'
2	3'-GCTCAAG TAC CGACCCGGGTTG-5'
3	5'-CGAGTTC CAT AGCTGGGCCCCAAC-3'
4	3'-GCTCAAG TAT CGACCCGGGTTG-5'
5	5'-CGAGAT TAT AGCTGGGCCCCAAC-3'
6	3'-GCTCTA AAT ATCGACCCGGGTTG-5'
7	5'-CGAGTT TAT TACTGGGCCCCAAC-3'
8	3'-GCTCAA AAT AATGACCCGGGTTG-5'
9	5'-CGAGTT GAT GGCGGGCCCCAAC-3'
10	3'-GCTCA ACT ACCGCGCCGGGTTG-5'
11	5'-CGAGTT AAT CGCGCGGGCCCCAAC-5'
12	3'-GCTCA ATT AGCGCGCCGGGTTG-5'
13	5'-CGAGTT CGT GGCTGGGCCCCAAC-3'
14	3'-GCTCA AGC ACCGACCCGGGTTG-5'
15	5'-CGAGTT CTT GGCTGGGCCCCAAC-3'
16	3'-GCTCA AGA ACCGACCCGGGTTG-5'
17	5'-CGAGTT CA AGGCTGGGCCCCAAC-3'
18	3'-GCTCA AGT TCCGACCCGGGTTG-5'
19	5'-CGAGTT C AGGCTGGGCCCCAAC-3'
20	3'-GCTCA AGT GCCGACCCGGGTTG-5''
21	5'-CGAGTT CGC GGCTGGGCCCCAAC-3'
22	3'-GCTCA AGC GCCGACCCGGGTTG-5'
23	5'-CGAGTT CAT GGCTGGGCCCCAAC-3'
24	3'-GCTCA AGT ACCGACCCGGGTTG-5'
25	5'-CTGAGTAC CAT GTCCAAGGCCTTGGACTTAA-3'
26	3'-GACTCAT GTA CAGGTTCCGGAACCTGAATT-5'
27	5'-CTGAGTAC(N6A) TG TCCAAGGCCTTGGACTTAA-3'
28	3'-GACTCAT GT(N6A) CAGGTTCCGGAACCTGAATT-5'
29	5'-CTGAGTA(5mC) AT GTCCAAGGCCTTGGACTTAA-3'
30	3'-GACTCAT GTA(5mC) AGGTTCCGGAACCTGAATT-5'
31	5'-CTGAGTA(N4C) AT GTCCAAGGCCTTGGACTTAA-3'
32	3'-GACTCAT GTA(N4C) AGGTTCCGGAACCTGAATT-5'

Предполагаемый сайт узнавания *FaeI* в каждом дуплексе выделен жирным шрифтом. Сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции *FaeI* (5'-CATG[^]-3') подчеркнут.

Одну из цепей олигонуклеотидного дуплекса метили по 5'-концу с помощью T4 полинуклеотидкиназы и γ -[³²P]АТФ. Меченый олигонуклеотид очищали гелефильтрацией на колонках MicroSpin G-25 (Amersham Biosciences UK Ltd., Великобритания) согласно протоколу производителя. Олигонуклеотидный дуплекс образовывали путем смешивания меченого олигонуклеотида

с комплементарным немеченым олигонуклеотидом до концентрации 180 нМ каждого в SE-буфере В. Реакционную смесь прогревали 5 минут при 95 °С, а затем остужали до комнатной температуры.

Гидролиз проводили 2 единицами фермента в 10 мкл реакционной смеси в течение 25 минут при 50 °С. Продукты гидролиза разделяли электрофорезом в денатурирующем 20% ПААГ с 7 М мочевиной в Трис-боратном буфере. Радиоавтограф геля получали с помощью Personal Molecular Imager (BioRad, USA).

За одну единицу активности принимали количество фермента, необходимое для гидролиза 1 пмоль олигонуклеотидного дуплекса 1/2 за 1 час при 50 °С в 20 мкл реакционной смеси, содержащей оптимальный SE-буфер В.

Результаты и обсуждение

Гидролиз плазмидной ДНК эндонуклеазой *FaiI*.

На рисунке 1 показана картина расщепления ДНК плазмиды ρ UC19 различными количествами эндонуклеазы *FaiI*. Как видно из этого рисунка, глубина гидролиза плазмиды зависит от количества используемого фермента. Поскольку четкую картину исчерпывающего сайт-специфического гидролиза плазмидной ДНК получить не удалось, было предположено, что *FaiI* расщепляет нуклеотидные последовательности с разной эффективностью.

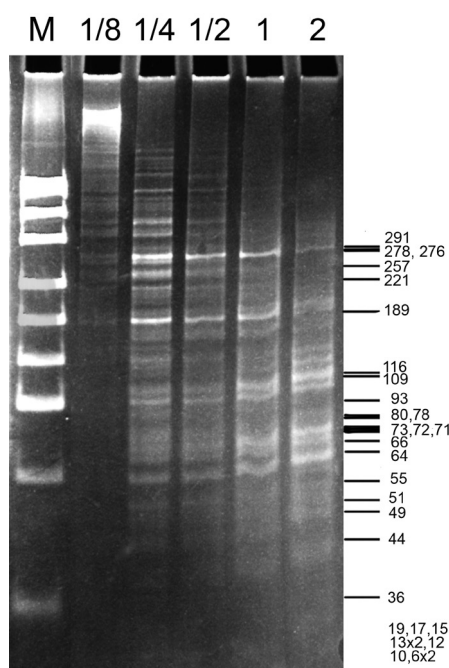


Рис. 1. Сайт-специфический гидролиз ДНК плазмиды ρ UC19 различными количествами эндонуклеазы *FaiI* в течение 1 часа. Цифрами обозначено использованное количество единиц фермента. Справа приведена теоретическая картина расщепления по сайту 5'-YATR-3'. М – маркер молекулярных масс ДНК – ρ UC19/*MspI*

Определение субстратной специфичности эндонуклеазы *FaiI*. Для выявления последовательностей, узнаваемых ферментом *FaiI*, были проведены эксперименты по гидролизу олигонуклеотидных дуплексов различного состава. В результате было установлено,

что наиболее эффективно эндонуклеаза *FaiI* расщепляет сайт узнавания 5'-YATR-3'. На рисунке 2 представлены результаты расщепления олигонуклеотидных дуплексов, содержащих варианты указанного сайта, а также некоторые сайты с заменами первого и четвертого нуклеотидов ферментом *FaiI*.

В соответствии с данными рисунка 2 *FaiI* проявляет максимальную активность на субстратах, содержащих сайт узнавания 5'-YATR-3' (5'-CATG-3' – дуплекс 1/2, 5'-САТА-3' – дуплекс 3/4, 5'-ТАТG-3' – дуплекс 4/3, 5'-ТАТА-3' – дуплекс 5/6), где наблюдается полное расщепление ДНК. В случае замены пурина или пиримидина (5'-ТАТТ-3' – дуплекс 7/8, 5'-ААТА-3' – дуплекс 8/7, 5'-GATG-3' – дуплекс 9/10, 5'-САТС-3' – дуплекс 10/9) наблюдается частичный гидролиз ДНК. Подобная слабая активность приблизительно в 8–10 раз ниже активности на оптимальном субстрате, она наблюдается на всех сайтах вида 5'-YATY-3' (данные не приводятся). В случае одновременной замены обоих крайних нуклеотидов, то есть и пурина и пиримидина, расщепления вообще не происходит (5'-ААТС-3' – дуплекс 11/12, 5'-GATT-3' – дуплекс 12/11).

На рисунке 3 приведены результаты гидролиза эндонуклеазой *FaiI* олигонуклеотидных дуплексов, содержащих сайт узнавания с заменами в центральной паре нуклеотидов.

Как видно из рисунка 3, при замене одного нуклеотида в центральной АТ паре фермент проявляет никакую активность, причем расщепляется та цепь сайта узнавания, в которой сохраняется тимин (дуплексы: 13/14 – 5'-СТТG-3' и 15/16 – 5'-CGТG-3'). Для исключения возможности влияния соседних нуклеотидов на никакую активность были проверены дуплексы того же состава, с зеркальным расположением цепей сайта узнавания (дуплексы 20/19 – 5'-СТТG-3' и 18/17 – 5'-CGТG-3'). Замена обоих центральных нуклеотидов приводит к полному отсутствию активности фермента (5'-CGCG-3' – дуплекс 21/22).

Определение места гидролиза ДНК эндонуклеазой *FaiI*. На рисунке 4 представлены результаты гидролиза олигонуклеотидного дуплекса 1/2 эндонуклеазой *FaiI* и рестриктазой *FaeI* (сайт узнавания 5'-CATG^3'). Продукты частичного расщепления того же дуплекса экзонуклеазой III использованы в качестве маркера молекулярных длин.

Как видно из рисунка 4, длина фрагмента ДНК, образующегося при расщеплении олигонуклеотидного дуплекса ферментом *FaiI*, на два нуклеотида короче,

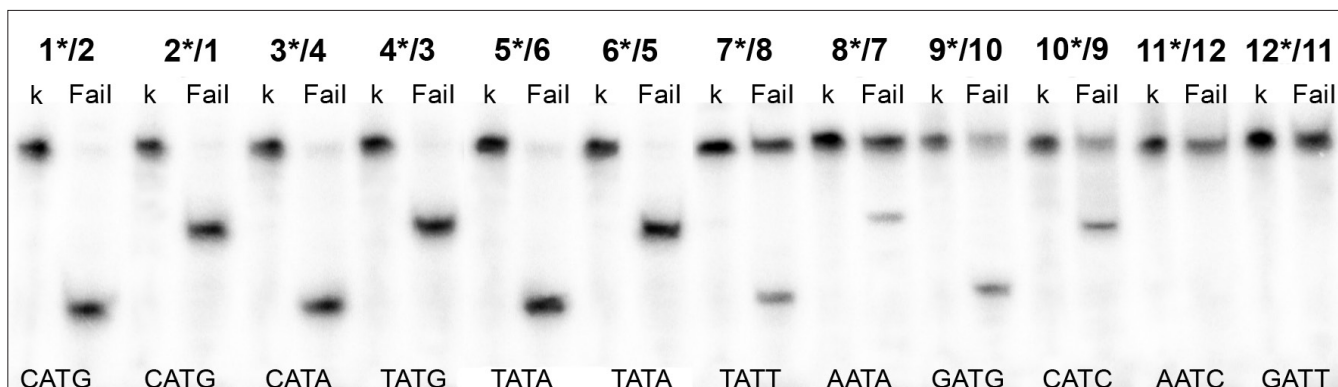


Рис. 2. Исходные (k) и гидролизованные эндонуклеазой FaiI (Fail) олигонуклеотидные дуплексы с заменами 1-го и 4-го нуклеотидов в сайте узнавания. * обозначены 5'-³²P меченные олигонуклеотиды в дуплексе. Внизу приведены последовательности ДНК в сайте узнавания фермента

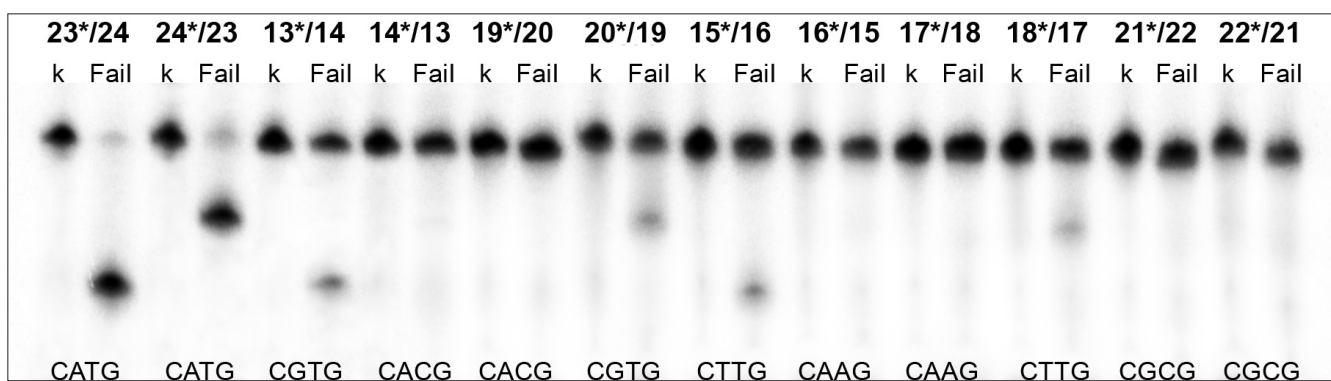


Рис. 3. Исходные (k) и гидролизованные эндонуклеазой FaiI (Fail) олигонуклеотидные дуплексы с заменами 2-го и 3-го нуклеотидов в сайте узнавания. * обозначены 5'-³²P меченные олигонуклеотиды в дуплексе. Внизу приведены последовательности ДНК в сайте узнавания фермента

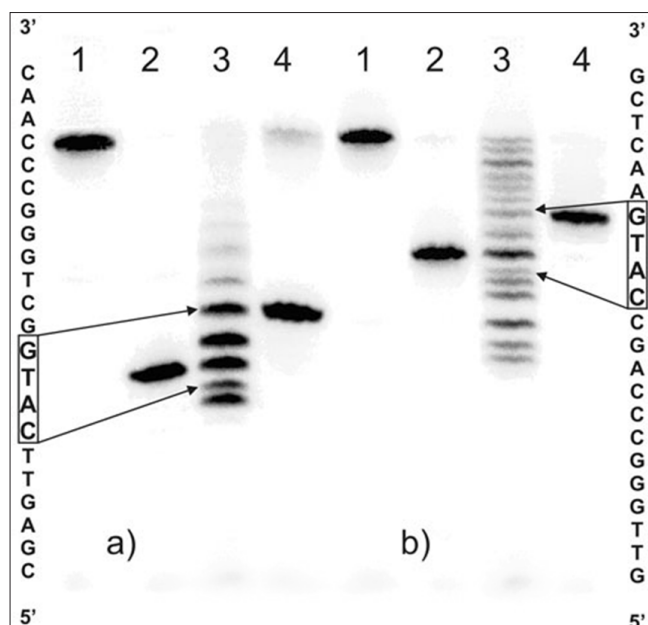


Рис. 4. Определение места гидролиза FaiI на дуплексе 1/2 в сравнении с FaeI: а) – 5'-³²P меченный олигонуклеотид 1; б) – 5'-³²P меченный олигонуклеотид 2. 1 – дуплекс 1/2; 2 – дуплекс 1/2 + FaiI; 3 – дуплекс 1/2 + EhoIII; 4 – дуплекс 1/2 + FaeI

чем длина продукта гидролиза FaeI. Следовательно, эндонуклеаза FaiI расщепляет последовательность ДНК 5'-CATG-3' сразу после аденина, образуя тупые концы.

В настоящее время описано лишь небольшое количество сайт специфических эндонуклеаз, узнающих и расщепляющих короткие (3–4 нуклеотида) вырожденные последовательности ДНК. К таким ферментам относится эндонуклеаза рестрикции CviJI и ее изоизомеры из *Chlorella virus*, узнающие и расщепляющие нуклеотидную последовательность 5'-RGCY-3' [7]. CviJI правомерно относить к эндонуклеазам рестрикции, поскольку она входит в состав соответствующей системы рестрикции-модификации. При этом метилаза РМ-системы CviJI модифицирует клеточную ДНК, делая ее устойчивой к расщеплению рестриктазой CviJI.

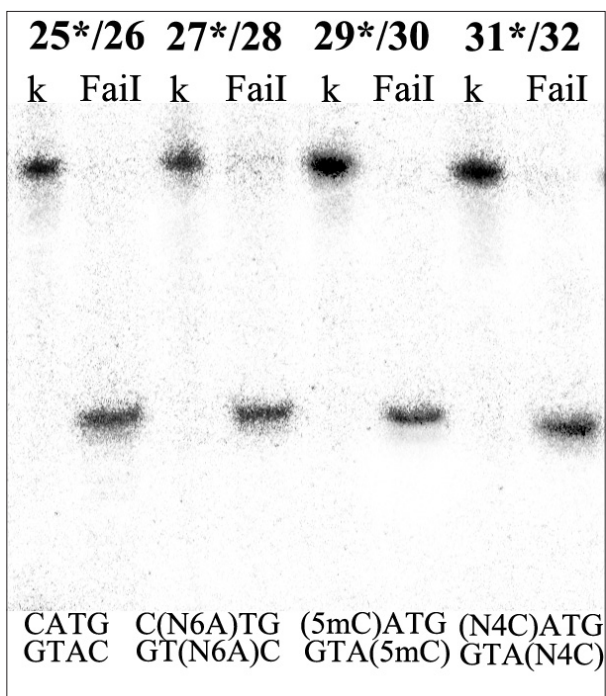


Рис. 5. Исходные (k) и гидролизованные эндонуклеазой FaiI (FaiI) олигонуклеотидные дуплексы с метилированными основаниями в сайте узнавания. * обозначены 5'-³²P меченные олигонуклеотиды в дуплексе. Внизу приведены сайты узнавания фермента

На рисунке 5 приведены данные по расщеплению последовательности 5'-CATG-3', содержащей различные метилированные основания, ферментом FaiI. Как видно из этого рисунка, FaiI расщепляет последовательность узнавания с метилированными основаниями N6A, N4C и 5mC. Таким образом, наличие указанных метилированных оснований в сайте узнавания фермента не блокирует его активность и остается неясным, почему ДНК *Flavobacterium aquatile* B15 не расщепляется

ферментом FaiI in vivo. Можно предположить, что FaiI является секретлируемым ферментом, в связи с чем клетки *Flavobacterium aquatile* B15 не нуждаются в соответствующей ДНК-метилтрансферазе. Возможно также, что ДНК *Flavobacterium aquatile* B15, в отличие от других бактериальных ДНК, дополнительно модифицирована, например, гликозилирована, и эта модификация блокирует гидролиз ДНК ферментом FaiI. Дальнейшие исследования позволят определить причину устойчивости ДНК *Flavobacterium aquatile* B15 к расщеплению ферментом FaiI.

Заключение

По сравнению с рестриктазами, которые, как правило, узнают и гидролизуют в ДНК последовательности из 4 и более нуклеотидов, эндонуклеаза FaiI расщепляет ДНК значительно глубже и соответственно может быть использована для более мелкой фрагментации ДНК и получения соответствующих геномных библиотек (quasi-random shotgun library) [7]. Кроме того, продукты расщепления ДНК в виде олигодезоксирибонуклеотидов могут применяться при мечении ДНК и картировании фрагментов рестрикционного анализа [7].

Литература

1. Янулайтис А.А. Ферменты рестрикции и их применение. Итоги науки и техники. ВИНТИ. Биотехнология. Т. 17. — М., 1989. — С. 201.
2. Degtyarev S.Kh., Kolyhalov A.A., Rechkunova N.I., Abdurashitov M.A. AcsI, a new restriction endonuclease from *Arthrobacter citreus* 310 recognizing 5'-Pu⁺AATTPy-3' // *Nucleic Acids Research*. — 1992. — Vol. 20. — P. 3789.
3. George J., Blakesley R.W., Chirikjian J.G. Sequence-specific endonuclease BamHI // *J. Biol. Chem.* — 1980. — Vol. 255. — P. 6521–6524.
4. Malyguine E., Vannier P., Yot P. Alteration of the specificity of restriction endonucleases in the presence of organic solvents // *Gene*. — 1980. — Vol. 8. — P. 163–177.
5. Pingoud A., Jeltch A. Structure and function of type two restriction endonucleases // *Nucleic Acid Research*. — 2001. — Vol. 29. — P. 3705–3727.
6. Polisky B., Greene P., Garfin D.E., McCarthy B.J., Goodman H.M., Boyer H.W. Specificity of substrate recognition by the EcoRI restriction endonuclease // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1975. — Vol. 72. — P. 3310–3314.
7. Swaminathan N., Mead D.A., McMaster K., George D., Van Etten J.L., Skowron P.M. Molecular cloning of the three base restriction endonuclease R.CviJI from eukaryotic *Chlorella virus* IL-3A // *Nucleic Acids Research*. — 1996. — Vol. 24. — P. 2463–2469.

SITE-SPECIFIC DNA ENDONUCLEASE FaiI RECOGNIZES DEGENERATE FOUR-NUCLEOTIDE SEQUENCE 5'-YA[^]TR-3'

Ju.E. TOMILOVA, V.A. CHERNUKHIN, S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme, Ltd., Novosibirsk

We have studied a substrate specificity of new site-specific DNA endonuclease FaiI. FaiI recognizes and cleaves nucleotide sequence 5'-YA[^]TR-3', displaying a weak activity in digestion of 5'-YA[^]TY sites. Replacement of one nucleotide in a central AT pair results in a nicking activity of the enzyme, which hydrolyses a chain carrying T in the recognition site. FaiI cleaves DNA with 5-methylcytosine, N4-methylcytosine and N6-methyladenine in the recognition sequence.

Keywords: site-specific endonuclease, degenerative recognition sequence, fine splitting endonuclease.

МИКРОБНЫЙ БИОСЕНСОР КАК ИНСТРУМЕНТ БИОТЕСТИРОВАНИЯ: ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ТОВАРОВ НАРОДНОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ

О.Н. ПОНАМОРЕВА^{1*}, И.Ф. ЧЕПКОВА², М.А. АНУФРИЕВ³,
В.А. АЛФЕРОВ¹, В.А. ЦЕГЛОВА³, Е.Н. МУЗАФАРОВ¹

¹ Тульский государственный университет,

² Тульская межобластная ветеринарная лаборатория,

³ Центр гигиены и эпидемиологии в Тульской области, Тула

Предложена методика экспресс-оценки токсичности товаров народного потребления из полимерных и текстильных материалов с помощью биосенсора на основе кислородного электрода, модифицированного иммобилизованными целыми бактериальными клетками. Использование тестовой культуры микроорганизмов позволило успешно отличать образцы, получившие отрицательные заключения токсикологической экспертизы, от нетоксичных образцов сравнения и дифференцировать их по степени токсичности. В основу методики положена способность бактерий к аэробной биодеградации ксенобиотиков, мигрирующих в водные вытяжки из исследуемых образцов.

Ключевые слова: биосенсор, иммобилизованные микроорганизмы, дыхательная активность клеток, токсичность.

Введение

Ежегодно в окружающую среду выбрасываются сотни новых загрязняющих веществ с неизвестной степенью токсичности и неизученным влиянием на человека. Ужесточение требований к их нормированию приводит к необходимости проведения сложных и дорогостоящих исследований. Экспертная группа анализа и контроля приоритетных соединений Европейского Союза (The Expert Group on the Analysis and Monitoring of Priority Substances) при работе над современным экологическим законодательством Европейского Союза столкнулась с трудностями, обусловленными отсутствием надежных стандартизированных методик определения некоторых веществ, а также с недостаточной чувствительностью доступных методов анализа [18]. В этом отношении биосенсоры продемонстрировали большой потенциал, и в последние годы создаются аналитические инструментальные средства на их основе для эффективного контроля в экологических программах [11]. Согласно

определению Международного Союза по чистой и прикладной химии (IUPAC), биосенсор — это интегральная система, которая способна воспринимать и преобразовывать специфичную количественную или полуколичественную аналитическую информацию с использованием биологического распознающего элемента (биохимического рецептора), находящегося в тесном контакте с преобразователем. Биосенсор отличается от любой биоаналитической системы, прежде всего, тем, что при его использовании в анализе нет необходимости в дополнительных процедурах, таких как добавление реагентов к анализируемой системе.

В области экологического мониторинга широкое применение нашли биосенсоры на основе целых клеток микроорганизмов. Преимущества микроорганизмов, такие как простота и низкая стоимость культивирования, возможность целенаправленного изменения свойств методами генной инженерии, широкая субстратная специфичность, наличие простых и универсальных способов измерения активности ферментов по общим показателям жизнедеятельности клетки, позволяют создавать рецепторные элементы биосенсоров на их основе для решения широкого круга задач. Одно из направлений — разработка микробных биосенсоров для определения конкретных токсикантов и ксенобиотиков: фенола и его производных [13, 21], ароматических углеводов [15], пестицидов [12], тяжелых металлов (в биодоступных формах) [4, 9], цианидов [14], поверхностно-активных веществ [17, 20] и других соединений [11]. Второе направление

© 2011 г. Понаморева О.Н., Чепкова И.Ф., Ануфриев М.А.,
Алферов В.А., Цеглова В.А., Музафаров Е.Н.

* Автор для переписки:

Понаморева Ольга Николаевна

к.х.н., доцент кафедры химии

Тульского государственного университета

300600 Тула, пр. Ленина, 92

Тел.: 8-915-783-80-13

E-mail: olga@tsu.tula.ru

— разработка биосенсорных систем для экологического мониторинга [5, 10, 19, 22] и оценки суммарной токсичности [4, 7, 8, 16].

Одна из важнейших задач современной токсикологической экспертизы — оценка токсичности товаров народного потребления [1]. Производство одежды, обуви, посуды, игрушек и других изделий из синтетических материалов привело к тому, что в настоящее время ощущается острая потребность во всесторонней оценке этой группы товаров по показателям безопасности для здоровья человека. В России имеются методические указания и рекомендации по применению методов биотестирования для оценки токсичности товаров, внесенные в Федеральный реестр методик выполнения измерений. Для регистрации токсического действия созданы автоматические анализаторы, внесенные в Госреестр измерительных средств РФ. Анализатор токсичности АТ-05 позволяет использовать в качестве тест-объекта сперму крупного рогатого скота, а прибор Биотокс-10М регистрирует интенсивность биолюминесценции бактерий для оценки токсичности.

Однако существующие методы экспресс-оценки токсичности помимо преимуществ имеют и свои ограничения. Предпочтительно комплексное использование нескольких биотестов, взаимно дополняющих друг друга по чувствительности к различным группам веществ; поэтому ведутся работы по поиску и выбору дополнительных тест-объектов. Как отмечалось выше, для определения загрязнения окружающей среды часто используют амперометрические биосенсоры на основе различных штаммов микроорганизмов. Воздействие ксенобиотиков на микроорганизмы приводит к изменению их дыхательной активности, что может использоваться для оценки токсичности различных объектов.

Цель настоящей работы — разработка методики биосенсорной оценки токсичности проб товаров народного потребления, основанной на изменении дыхательной активности иммобилизованных микроорганизмов при воздействии на них токсичных соединений.

Материалы и методы

В работе использовали штамм бактерий ВКПМ В-3254 *Escherichia coli* K-12 F+StrR, полученный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ ГосНИИгенетика). Среды стерилизовали автоклавированием в течение 45 минут при давлении

1 атм сверх атмосферного. Культуру поддерживали на агаризованной питательной среде LB с добавлением стрептомицина (100 мкг/дм³), содержащей (г/дм³): триптон — 10, дрожжевой экстракт — 5, NaCl — 10, агар — 15. Для получения биомассы микроорганизмов проводили их культивирование в жидкой среде того же состава (без добавления агара) в колбах на 750 см³ в течение 24 часов при температуре 37 °С и скорости перемешивания 180 об/мин. Полученную биомассу центрифугировали при 8000 g в течение 10 мин., трижды промывали 1/15 М Na-К-фосфатным буферным раствором (рН=7,0) и хранили в холодильнике при 4 °С.

Формирование рецепторных элементов осуществляли методом включения биомассы в агаровый гель. На кипящей водяной бане нагревали при перемешивании 250 мг агара и 90 мг NaCl в 10 см³ дистиллированной воды в течение 15 минут. Раствор охлаждали до 55 °С. Биомассу клеток смешивали в соотношении 1 : 5 с агаровым гелем и выдерживали 1 час при комнатной температуре. Из застывшего геля, содержащего целые клетки микроорганизмов, формировали рецепторные элементы в виде тонких срезов диаметром 4 мм и толщиной ≈0,5 мм и фиксировали их на электроде Кларка с помощью нейлоновой сетки, так чтобы иммобилизованные микроорганизмы имели непосредственный контакт с рабочей поверхностью электрода.

Образцы готовили согласно действующим нормативным документам (МУК 4.1/4.3.2038-05, МУ 1.1.037-95, МУК 4.1/4.3.1485-03). Для приготовления водных вытяжек образцы измельчали и взвешивали. Образцы одежды подвергали процедуре «стирки» согласно МУК 4.1/4.3.1485-03. Затем пробы помещали в емкости с дистиллированной водой и термостатировали при 37 °С в течение 1 часа. В качестве образца для контрольного опыта использовали дистиллированную воду, которую готовили аналогично вытяжкам из образцов.

Исследования проводили на биосенсорной установке, состоящей из потенциостата ИРС-Micro (ОАО «Кронас», Россия) и кислородного электрода типа Кларка. Измерения выполняли при постоянном потенциале —700 мВ в открытой кювете при постоянном перемешивании на магнитной мешалке ММ-5 и комнатной температуре. В качестве фонового раствора использовали 5 см³ 1/15 М Na-К-фосфатного буфера (рН=7,0). После стабилизации дыхательной активности клеток в кювету добавляли 500 мм³ водной вытяжки из исследуемой пробы. Измеряемым параметром (откликом биосенсора) являлась максимальная скорость изменения выходного сигнала биосенсора (нА/мин.)

при добавлении проб. Выходной сигнал — сила тока, обратно пропорциональная концентрации кислорода в приэлектродном пространстве. Между измерениями проводили трехкратное промывание кюветы и электрода буферным раствором. Для каждого раствора проводили по три измерения отклика биосенсора.

Результаты и обсуждение

Ранее авторами была показана принципиальная возможность применения микробного сенсора на основе кислородного электрода для оценки токсичности различных товаров народного потребления [3]. Сравнение откликов биосенсора с рецепторными элементами на основе нескольких штаммов микроорганизмов родов *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Hansenula* позволило выявить наиболее перспективный биоматериал для дальнейших исследований (*E. coli* К-12), так как использование этих микроорганизмов дало возможность уже после 1 часа экспозиции отличить большинство образцов, получивших неудовлетворительные заключения токсикологической экспертизы, от нетоксичных образцов сравнения. Поэтому в настоящей работе в качестве рецепторных элементов использовали иммобилизованные в агаровый гель целые клетки бактерий *E. coli* К-12. Они являются стандартными объектами биотестирования в некоторых методиках (в частности, их модификация, содержащая lux-ген), а их свойства, субстратная специфичность и пути биодеградации ксенобиотиков хорошо изучены. Работа по полному секвенированию генома *E. coli* К-12 была завершена в 1997 г. [6].

Под биологической активностью ксенобиотика понимают его способность изменять функциональные возможности компонентов организма, всего организма в целом или сообщества организмов. При характеристике негативного действия ксенобиотика принято различать понятия «токсичность» и «опасность». Токсичность — это мера несовместимости вещества с жизнью, величина, обратная абсолютному значению среднесмертельной дозы ($1/LD_{50}$) или концентрации ($1/LC_{50}$). Опасность вещества — вероятность проявления вредных для организма эффектов в реальных условиях. Принцип LD_{50} и LC_{50} может быть распространен на любую классификацию и не обязательно связан с гибелью организма. В этой связи можно говорить о дозе (концентрации) ксенобиотика, вдвое изменяющей любую тест-реакцию (скорость биосинтеза белка, мембранный потенциал, потребление кислорода и т.д.).

Для количественного измерения тест-реакции (в данном случае дыхательной активности микрооргани-

мов) при действии ксенобиотика необходимо использовать стандартный образец положительного контроля. Авторы предложили использовать водный раствор ацетальдегида [17], что обусловлено несколькими причинами. Содержание ацетальдегида в водных вытяжках из исследуемых товаров нормируется, в том числе в Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требованиях, принятых в 2010 году странами-членами таможенного союза (ПДК ацетальдегида в водных вытяжках из исследуемых товаров составляет $0,2 \text{ мг/дм}^3$ [1, 3, 7]). При этом альдегиды часто встречаются в товарах народного потребления, получивших отрицательные заключения токсикологической экспертизы. Ацетальдегид — это опасный токсикант, ирритант и возможно канцероген, продукт разложения многих органических веществ, применяемых в промышленности (например, винилалкиловых эфиров, окиси этилена, паральдегида, дибутилацетала и др.). Также он является агрессивным промежуточным метаболитом, образующимся при биодеградации ксенобиотиков, угнетающим биосинтез белка, вызывающим образование очагов некроза в сердечной мышце млекопитающих и подавляющим активность ферментов окислительного фосфорилирования.

Градуировочную зависимость строили по результатам серии измерений откликов сенсора на добавление растворов с различными концентрациями ацетальдегида (от $1,0 \text{ мг/дм}^3$ до 20 мг/дм^3). Изменение дыхательной активности бактерий, вызванное воздействием токсиканта, регистрировали с помощью кислородного электрода, подключенного к биосенсорной установке, в виде графика зависимости силы тока, протекающего в цепи, от времени (рис. 1).

Экспериментальные данные аппроксимированы с помощью уравнения прямой (рис. 2). Увеличение концентрации ацетальдегида приводит к росту отклика биосенсора.

В пределах выбранного диапазона концентраций зависимость отклика сенсора от концентрации ацетальдегида линейна ($R=0,9964$). Параметры градуировочной зависимости: α (коэффициент чувствительности) равен $2,1 \pm 0,2 \text{ нА} \cdot \text{дм}^3 / \text{мин} \cdot \text{мг}$, y_0 (фоновый сигнал) равен $0,4 \pm 0,1 \text{ нА/мин}$.

Основываясь на принципе LD_{50} и LC_{50} и дозе (концентрации) вещества, вдвое снижающей тест-реакцию (отклик сенсора на основе *E. coli* К-12), за порог токсичности приняли отклик сенсора на 10 ПДК ацетальдегида (так как предел чувствительности устойчиво регистрируется на уровне 5 ПДК). Величина порога токсичности — $3,1 \text{ нА/мин}$ при фоновом сигнале $0,3 \pm 0,1 \text{ нА/мин}$.

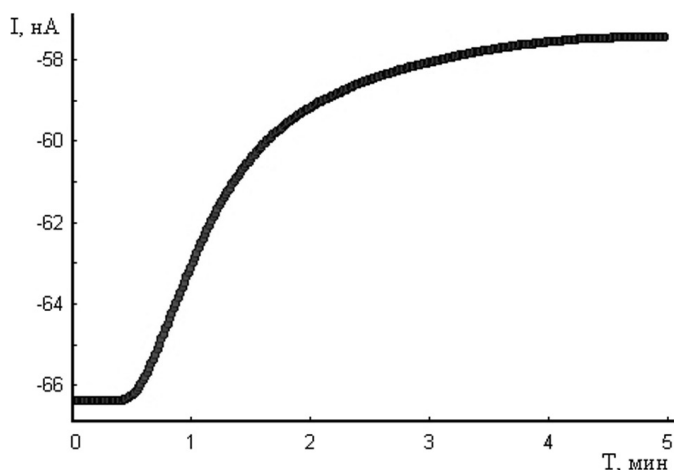


Рис. 1. Отклик биосенсора при добавлении в кювету 500 мм³ раствора, содержащего 20 мг/дм³ (100 ПДК) ацетальдегида

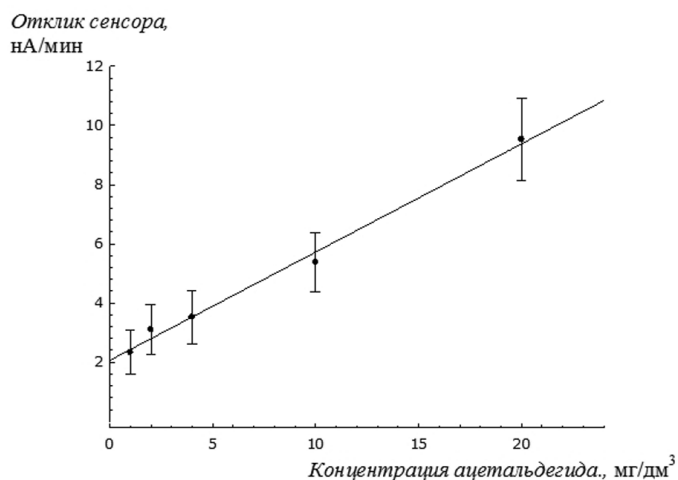


Рис. 2. Зависимость отклика сенсора на основе *E. coli* К-12 от концентрации ацетальдегида (от 1,0 мг/дм³ – 5 ПДК – до 20 мг/дм³ – 100 ПДК). Объем вводимой пробы 500 мм³

удовлетворительные санитарно-гигиенические заключения (№ 11–13). Контрольным раствором служила дистиллированная вода (№ 14).

Биосенсор на основе бактерий *E. coli* К-12 давал значительные отклики на образцы 1–10. Отклики сенсора на образцы 1, 2, 3, 7 очень близки к порогу токсичности, и эти пробы можно характеризовать как слаботоксичные. Отклики сенсора на образцы 4, 5, 6, 9 выше порога токсичности, и их можно характеризовать как токсичные. Отклики сенсора на образцы 8 и 10 более чем в 2 раза выше порога токсичности, и эти образцы можно характеризовать как сильнотоксичные. При этом отклик на образцы сравнения и образец контрольного опыта значительно ниже порога токсичности (рис. 3.).

Ответ сенсора, нА/мин

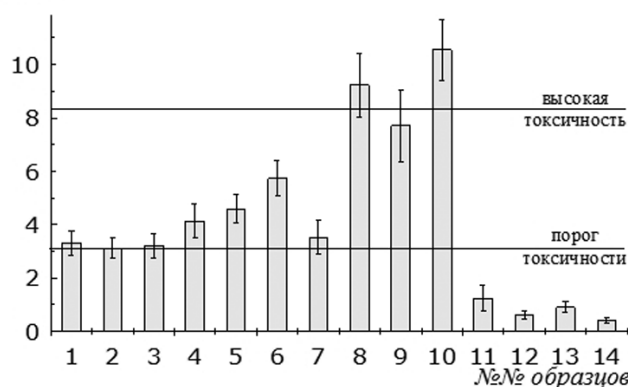


Рис. 3. Результаты исследования водных вытяжек из реальных образцов с помощью биосенсора на основе *E. coli* К-12

Полученные с помощью биосенсора результаты согласуются с данными, полученными аналитическими методами, а также с результатами биотестирования на приборе АТ-05 (табл. 1.).

Следует отметить некоторые различия в результатах оценки разными методами. Для образцов 1 и 3 индекс токсичности при исследовании на АТ-05 составил 88,0 и 97,4%, что характеризует их как нетоксичные. Но данные образцы поступили по жалобе на сильный неприятный запах, а также в них обнаружили производные фталевой кислоты. В результате токсикологической экспертизы они получили неудовлетворительные заключения. Результаты биосенсорной оценки токсичности в данном случае совпали с результатами токсикологической экспертизы. Образец 7 при оценке токсичности с помощью биосенсора определен как слаботоксичный образец (отклик сенсора 3,5±0,6 нА/мин.), что не совпало с результатами исследования по утвержденным методикам.

Сравнение полученных различными методами результатов оценки токсичности образцов товаров народного потребления

№	Образец	Метод исследования			Органолептика
		Биосенсор (оценка токсичности/ отклик сенсора, нА/мин.)	Биотестирование на АТ-05 (норма: ИТ от 80 до 120%)	Аналитические методы (ГХ/МС, ААС, ГХ и др.)	
1	Сланцы синие	Слаботоксичен/ (3,3±0,5)	88,0	бис(2-метил-пропиловый) эфир 1,2-бензол-дикарбоновой кислоты	Сильный неприятный запах
2	Сланцы фиолетовые	Слаботоксичен/ (3,1±0,4)	78,0	бис(2-метил-пропиловый) эфир 1,2-бензол-дикарбоновой кислоты	Сильный неприятный запах
3	Сланцы серые	Слаботоксичен/ (3,2±0,4)	97,4	нитропроизводное 1,2-бензол-дикарбоновой кислоты	Сильный неприятный запах
4	Игрушка детская (погремушка)	Токсичен/ (4,1±0,6)	55,3	Фенолы – 0,4 мг/л	Запах отсутствует
5	Брюки черные	Токсичен/ (4,6±0,5)	77,0	Альдегиды – 0,10 мг/л в пер. на формальдегид	н/д
6	Брюки белые	Токсичен/ (5,7±0,7)	69,8	Альдегиды – 0,15 мг/л в пер. на формальдегид	н/д
7	Брюки серые	Слаботоксичен/ (3,5±0,6)	81,0	Альдегиды не обнаружены	н/д
8	Свитер бежевый	Сильнотоксичен/ (9±1)	55,3	Альдегиды – 0,20 мг/л в пер. на формальдегид	н/д
9	Свитер синий	Токсичен/ (8±1)	68,1	Альдегиды – 0,15 мг/л в пер. на формальдегид	н/д
10	Спортивный костюм синий	Сильнотоксичен/ (10±1)	62,2	Альдегиды – 0,15 мг/л в пер. на формальдегид	н/д
11	Спортивный костюм зеленый	Нетоксичен/ (1,2±0,5)	92,3	Фенолы, альдегиды не обнаружены	н/д
12	Игрушка детская (уточка)	Нетоксичен/ (0,6±0,1)	95,3	Фенолы, альдегиды не обнаружены	Запах отсутствует
13	Бутылка пластиковая	Нетоксичен/ (0,9±0,2)	102,1	Фенолы, альдегиды не обнаружены	Запах отсутствует
14	Вода дистиллированная	Нетоксичен/ (0,4±0,1)	98,8	Фенолы, альдегиды не обнаружены	Запах отсутствует

Возможно, это как раз тот случай, когда требуется использование большего числа тест-объектов, дополняющих друг друга для более правильной оценки токсичности.

Заключение

В настоящей работе авторами предложена методика экспресс-оценки токсичности товаров народного потребления из полимерных и других материалов с применением биосенсора на основе кислородного электрода, модифицированного иммобилизованными целыми бактериальными клетками. Использование тестовой культуры *E. coli* К-12 позволило не только успешно отличить образцы, получившие отрицательные заключения токсикологической экспертизы, от нетоксичных образцов сравнения, но и дифференцировать образцы по степени токсичности, используя в качестве стандартного образца водный раствор ацетальдегида. Применение непатогенных для человека и хорошо изученных микроорганизмов, а также приборов, внесенных в Государственный реестр средств измерений, в сочетании с простотой и экспрессностью подготовки проб и анализа делает предложенную методику перспективной для использования в лабораториях, выполняющих токсикологические исследования указанной группы товаров.

Работа выполнена при поддержке в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы», госконтракты №П976, №02.740.11.0296.

Литература

1. Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащих санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю). — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. — 707 с.
2. Общая токсикология. / Под ред. А.О. Лойта. — СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2006. — 224 с.
3. Чепкова И.Ф., Ануфриев М.А., Пономарева О.Н., Алферов В.А., Решетиллов А.Н., Щеглова В.А., Петрова С.Н. Применение биосенсора на основе иммобилизованных микроорганизмов для оценки токсичности продукции бытового назначения и товаров для детей // Токсикологический вестник. — 2010. — Т. 100. — № 1. — С. 34–40.
4. Angela I., Rõlova T., Kahru A. A suite of recombinant luminescent bacterial strains for the quantification of bioavailable heavy metals and toxicity testing // BMC Biotechnology. — 2009. — Vol. 9. — P. 41.
5. Belkin S. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants // Curr. Opin. Microbiol. — 2003. — Vol. 6(3). — P. 206–212.
6. Blattner F.R., Plunket III.G., Bloch C.A. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K12 // Science. — 1997. — Vol. 277. — P. 1453–1462.
7. Campanella L., Favero G., Tomassetti M. Immobilised yeast cell biosensor for total toxicity testing // Sci. Tot. Envir. — 1995. — Vol. 171. — P. 227–234.
8. Dorward E. and Barlsas B. Acute toxicity screening of water pollutants using a bacterial electrode // Environ. Sci. Technol. — 1984. — Vol. 18. — P. 967–972.
9. Fu Ya-Juan, Chen Wen-Li, Huang Qiao-Yun. Construction of two lux-tagged Hg²⁺-specific biosensors and their luminescence performance // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — Vol. 79. — P. 363–370.
10. Hanrahan G., Patil D.G., Wang J. Electrochemical sensors for environmental monitoring: design, development and applications // J. Environ. Monit. — 2004. — Vol. 6. — N 8. — P. 657–664.
11. Lei Y., Chen W., Mulchandani A. Microbial biosensors. Review // Anal. Chim. Acta. — 2006. — Vol. 568. — P. 200–210.
12. Mulchandani P., Chen W., Mulchandani A., Wang J., Chen L. Amperometric microbial biosensor for direct determination of organophosphate pesticides using recombinant microorganism with surface expressed organophosphorus hydrolase // Biosens. Bioelectron. — 2001. — Vol. 16. — P. 433–437.
13. Mulchandani P., Hangarter C.M., Lei Y., Chen W., Mulchandani A. Amperometric microbial biosensor for p-nitrophenol using *Moraxella* sp.-modified carbon paste electrode // Biosens. Bioelectron. — 2005. — Vol. 21. — N 3. — P. 523–527.
14. Okochi M., Mima K., Miyata M., Shinozaki Y., Haraguchi S., Fujisawa M., Kaneko M., Masukata T., Matsunaga T. Development of an automated water toxicity biosensor using *Thiobacillus ferrooxidans* for monitoring cyanides in natural water for a water filtering plant // Biotechnol. Bioeng. — 2004. — Vol. 87. — P. 905–911.
15. Paitan Y., Biran I., Shechter N., Biran D., Rishpon J., Ron E.Z. Monitoring aromatic hydrocarbons by whole cell electrochemical biosensors // Anal. Biochem. — 2004. — Vol. 335. — P. 175–183.
16. Rawson D., Willmer A. and Turner A. Whole-cell biosensors for environmental monitoring // Biosensors. — 1989. — Vol. 4. — P. 299–311.
17. Reshetilov A.N., Semenchuk I.N., Iliasov P.V., Taranova L.A. The amperometric biosensor for detection of sodium dodecyl sulfate // Anal. Chim. Acta. — 1997. — Vol. 347. — P. 19–26.

18. *Rodrigues-Mozaz S., Lopez de Alda M.J.* Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring. Review // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2006. – Vol. 386. – N. 4. – P. 1025–1041.
19. *Rogers K.R.* Chip-based biosensors for environmental monitoring. Review / In: *Handbook of Biosensors and Biochips* (2 Volume set). Robert S. Marks, Christopher R. Lowe, David C. Cullen, Howard H. Weetall, Isao Karube (Eds.). Part six, chap. 75 (p. 1–7). – Wiley-Interscience, 2007. – 1500 p.
20. *Taranova L., Semenchuk I., Manolov T., Iliasov P., Reshetilov A.N.* Bacteria-degraders as the base of an amperometric biosensor for detection of anionic surfactants // *Biosens. Bioelectron.* – 2002. – Vol. 17. – P. 635–640.
21. *Timur S., Pazarlio N., Pillotonb R., Telefoncua A.* Detection of phenolic compounds by thick film sensors based on *Pseudomonas putida* // *Talanta.* – 2003. – Vol. 61. – N 2. – P. 87–93.
22. *Wanekaya A.K., Chen W., Mulchandani A.* Recent biosensing developments in environmental security // *J. Environ. Monit.* – 2008. – Vol. 10. – N 6. – P. 703–712.

MICROBIAL BIOSENSOR AS A TOOL FOR BIOASSAY: ASSESSMENT OF THE TOXICITY OF CONSUMER GOODS

O.N. PONAMOREVA¹, I.F. CHEPKOVA², M.A. ANUFRIEV³,
V.A. ALFEROV¹, V.A. SCHEGLOVA³, E.N. MUZAFAROV¹

¹ *Tula State University,*

² *Tula Interregional Veterinary Laboratory,*

³ *Center for Hygiene and Epidemiology in the Tula region, Tula*

The authors offer a procedure of express-assessment of toxicity of consumer goods made of polymeric and textile materials using a biosensor based on the oxygen electrode modified by immobilized whole bacterial cells. The usage of the test culture of microorganisms made it possible to distinguish the samples which have got negative toxicological examination results from non-toxic samples and differentiate them according to the degree of toxicity. The testing procedure is based on bacteria ability to aerobic biodegradation of xenobiotic compounds migrating to aqueous extract of sample matrix.

Keywords: biosensor, immobilized microorganisms, respiratory activity of cells, toxicity.

ПРИМЕНЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР НЕРВНЫХ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ ДЛЯ ОТБОРА СОЕДИНЕНИЙ С НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

И.А. ГРИВЕННИКОВ, О.В. ДОЛОТОВ, Л.С. ИНОЗЕМЦЕВА, С.А. АНТОНОВ*,
А.Г. КОБЫЛЯНСКИЙ, Н.Ф. МЯСОЕДОВ

Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной генетики РАН, Москва

Разработан прототип тест-системы для поиска и отбора соединений на нейропротекторную активность, основанной на использовании первичных нейрональных и глиальных клеточных культур, полученных из мозга крысы. Уникальность разработанной тест-системы заключается не только в использовании при тестировании двух видов клеток (нейронов и глии), но и в оценке исследуемых соединений на способность стимулировать экспрессию защитных для клетки генов, в частности генов нейротрофинов, таких как NGF и BDNF, что дает дополнительную информацию о свойствах исследуемых соединений. Применение предлагаемой тест-системы позволяет осуществлять ускоренный скрининг (порядка 1 месяца) большого количества соединений различной природы на наличие у них нейропротекторной активности, а также проводить выявление побочных активностей этих соединений, таких как, например, эффект на пролиферацию.

Ключевые слова: первичные культуры, нервные клетки, глиальные клетки, нейропротекция, регуляторные пептиды, нейротрофины, пролиферация.

Введение

Создание клеточных тест-систем для оценки влияния лекарственных субстанций на дифференцировку, жизнеспособность (цитотоксичность) и пролиферативную активность клеток является актуальной проблемой современной биотехнологии. Клеточные линии применяются для тестирования и изучения механизма действия различных веществ, которые могут быть в дальнейшем использованы в качестве основы для создания лекарственных препаратов, детергентов, косметических средств, инсектицидов, консервантов.

Применение клеточных технологий в этой области связано и с тем, что исследования на животных, проводимые с целью определения, в частности, безопасного действия лекарственных средств, подвергаются определенной критике не только со стороны противников вивисекции, но и клиницистами, а также самими токсикологами. Это касается как этических норм, так

и научной значимости получаемых результатов [5]. Ввиду фундаментальных различий в анатомии, физиологии, патологии и метаболизме человека и животных данные относительно эффективности и токсического действия лекарственных препаратов, получаемые на моделях с использованием животных, часто не находят адекватного подтверждения в клинике [13, 16]. Поэтому вполне обоснованной является разработка адекватных альтернативных методов исследования *in vitro* [7, 17], предусматривающих использование соответствующих культур клеток млекопитающих, включая человека. Кроме того, поскольку клетки в культуре легкодоступны для различных биохимических манипуляций, при работе с ними радиоактивные предшественники, яды, гормоны и другие агенты могут быть введены в заданной концентрации и в течение точно заданного периода. Исчезает опасность и того, что исследуемое соединение метаболизируется, накапливается в мышцах или экскретируется почками. При использовании клеточных культур, как правило, легко установить время контакта исследуемого вещества с клетками, изменение его концентрации в течение определенного периода. Это обеспечивает получение реальных значений скорости включения или метаболизма исследуемых соединений, выявление мишеней действия веществ, которые впоследствии могут быть использованы в качестве маркеров токсичности. Внедрение методов *in vitro* позволяет разрабатывать и

© 2011 г. Гривенников И.А., Долотов О.В., Иноземцева Л.С., Антонов С.А., Кобылянский А.Г., Мясоедов Н.Ф.

* Автор для переписки:

Антонов С.А., аспирант
Учреждение Российской академии наук
Институт молекулярной генетики РАН
123182 Москва, пл. акад. Курчатова, 2
Тел.: (499) 196-02-11

использовать фармакологические и токсикологические скрининговые системы для создания новых субстанций на базе зависимости «структура-активность», дает возможность использовать биологические системы, полученные от генетически модифицированных животных, определенные метаболические звенья которых приближены к таковым человека, а также создавать большое количество разнообразных экспериментальных условий одновременно, следовательно, ускорять и повышать надежность исследований.

В создании моделей для изучения воздействия тех или иных соединений *in vitro* используются самые разные культуры клеток — первичные культуры различных тканей, культуры эмбриональных стволовых клеток, плюрипотентные стволовые клетки и т.д. Например, в исследованиях, посвященных изучению влияния твердых атмосферных примесей на развитие воспалительных процессов в сердечно-сосудистой и легочной системах человека, успешно применялась культура клеток эндотелия сосудов человека [15]; эмбриональные стволовые клетки использовались при изучении кардио- и гепатотоксичности различных агентов [18]; в аналогичных исследованиях использовались первичная культура клеток хондроцитов человека [10], гепатоциты форели [4], эпителиальные клетки бронхов человека [8] и т.д.

В настоящей работе были использованы первичные культуры нейронов и глиальных клеток мозга крысы для оценки нейропротекторных свойств ряда пептидов, относящихся к семейству меланокортинов. Хорошо известно, что заболевания центральной нервной системы (ЦНС) человека, обусловленные нейродегенеративными процессами, входят в настоящее время в тройку наиболее смертоносных болезней, наряду с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями. Доля нейродегенеративных заболеваний в общей структуре заболеваемости возрастает при увеличении продолжительности жизни человека. Наиболее распространенными среди них являются болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и инсульт. Например, болезнью Альцгеймера в мире в настоящее время страдает, по разным оценкам, более 10 миллионов человек [11]. Согласно прогнозам, в случае, если не будет найдено средство против этой болезни, то уже через 25 лет от этого недуга будут страдать до 30 миллионов жителей нашей планеты, а через 50 лет — примерно 45–50 миллионов [11, 12]. Сходная ситуация и с инсультом. Ежегодно в мире переносят инсульт более 6 миллионов человек. В России в год регистрируется до 450 тысяч инсультов, причем большинство из них относится к тяжелой и

средней степени тяжести. Лишь около 20% выживших больных могут вернуться к прежней работе [1].

В свете этого задача эффективного поиска и отбора соединений с нейропротекторной активностью ныне представляется чрезвычайно актуальной. Поэтому целью настоящего исследования явилась разработка прототипа тест-системы, основанного на использовании первичных культур нервных и глиальных клеток млекопитающих, позволяющей проводить поиск и отбор соединений с нейропротекторной активностью.

Материалы и методы

Получение клеточных культур. *Первичные диссоциированные культуры нейронов.* Первичные диссоциированные культуры нейронов базальных ядер переднего мозга крысы получали из 16–17-дневных эмбрионов (E16–17) по стандартной методике [9]. Крыс линии Спрейг-Доули массой 200–300 г ссаживали в соотношении 1 самец — 3 самки после 18 ч вечера; следующий день после рассаживания считался первым днем беременности. Крыс на 16–17-й дни беременности умерщвляли методом углекислотной асфиксии (15 мин.) и помещали на 1 мин. в 80% раствор этанола в воде. Далее все операции проводили в асептических условиях при температуре 4 °С.

Выделенный из эмбриона мозг помещали в раствор Хэнкса и далее выделяли базальные ядра переднего мозга после освобождения ткани от оболочек. Выделенную ткань один раз промывали раствором Хэнкса и переносили в среду MEM/F12 (1 : 1), содержащую 20% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и 2 мМ L-глутамин. Ткань механически диссоциировали на отдельные клетки с помощью пипетирования. Полученную клеточную суспензию два раза промывали средой с помощью центрифугирования.

Проводили подсчет клеток в гемоцитометре (камера Горяева) и засеивали с плотностью 100 тыс. клеток/см² на обработанные поли-L-лизинем 12-луночные планшеты (или 24-луночные планшеты) в среде MEM/F12 (1 : 1), содержащей 6 г/л D-глюкозы, 2 мМ L-глутамин, 25 мг/л инсулина, 100 мг/л трансферрина, 20 нМ прогестерон, 100 нМ путресцин и 30 нМ селенит натрия. Культивирование клеток проводили в CO₂-инкубаторе при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Аналогичным образом получали первичные нейрональные культуры и из других отделов мозга эмбрионов крысы (гиппокамп, кора больших полушарий, мозжечок, средний мозг) (рис. 1).

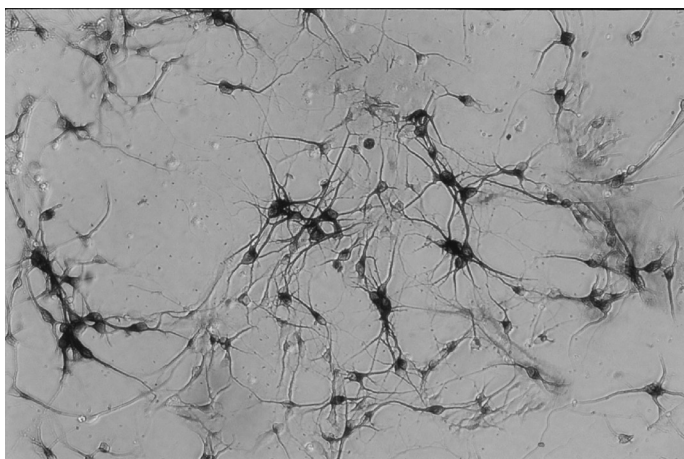


Рис. 1. Первичная нейрональная культура (7 DIV) базальных ядер переднего мозга крысы (Е 17). Иммуноцитохимическое окрашивание с помощью антител к MAP-2 ($\times 200$)

Первичные культуры глиальных клеток. Первичную культуру глиальных клеток получали согласно стандартной методике [6] Крыс линии Спрейг-Доули или Уистар в возрасте 1–3 дня умерщвляли с помощью углекислотной асфиксии (15 мин.) и помещали на 1 мин. в 80% раствор этанола в воде. Далее все операции проводили в асептических условиях при температуре 4 °С. Выделенный мозг помещали в раствор Хэнкса и далее выделяли базальные ядра переднего мозга, освобождая ткань от оболочек. Выделенную ткань один раз промывали раствором Хэнкса и переносили в среду MEM/F12 (1:1), содержащую 20% ЭТС и 2 мМ L-глутамин. Ткань механически диссоциировали на отдельные клетки с помощью пипетирования. Полученную клеточную суспензию один раз промывали средой того же состава с помощью центрифугирования при 200 g. Проводили подсчет клеток в гемоцитометре (камера Горяева) и засеивали плотностью 200 тыс. клеток/см² на обработанные поли-L-лизинем культуральные флаконы площадью 75 см². Культивирование клеток проводили в CO₂-инкубаторе при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO₂ и 95% воздуха, в среде MEM/F12, содержащей 15% ЭТС, 2 мМ L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина. Культуральную среду меняли каждые 3 дня. Пересев клеток проводили после образования монослоя в соотношении 1 : 3. Для экспериментов использовали клетки, полученные после третьего пересева (рис. 2).

Оценка уровня пролиферации клеток. Пролиферацию клеток оценивали методом измерения включения ³H-тимидина в ДНК клеток. Клетки высевали на 24-луночные планшеты (плотностью 100 тыс. клеток/

см²), выдерживали 48 ч в среде DMEM, содержащей 1% ЭТС и 2 мМ L-глутамин, в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ и 95% воздуха при 37 °С, затем добавляли исследуемый пептид, ЭТС (до концентрации в среде 15%) в качестве положительного контроля и ³H-тимидин (ОХФВБ ИМГ РАН) до конечной концентрации 1 мКи/мл или только ³H-тимидин (контроль).

Инкубацию с добавленными соединениями и ³H-тимидином проводили в течение 24 ч в аналогичных условиях. Затем культуральную среду отбирали, добавляли на 10 мин. метанол, высушивали на воздухе, 2 раза промывали PBS (4 °С) и 3 раза по 10 мин. промывали 10%-ным раствором трихлоруксусной кислоты (4 °С). Клетки лизировали в 200 мкл раствора 1% SDS и 0,3 М NaOH (30 мин. при комнатной температуре при перемешивании), затем добавляли 200 мкл 0,3 М соляной кислоты и определяли радиоактивность на сцинтилляционном счетчике «Mark-3» (Nuclear Chicago, США).

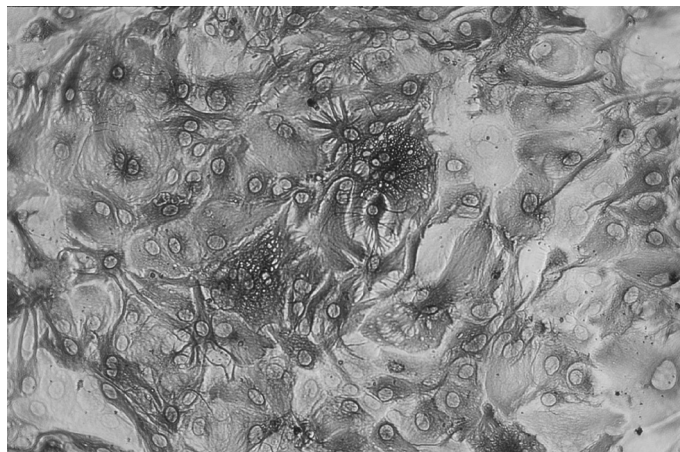


Рис. 2. Первичная глиальная культура базальных ядер переднего мозга (P1). Иммуноцитохимическое окрашивание с помощью антител к GFAP ($\times 200$)

Оценка выживаемости нейронов *in vitro*.

Культивирование первичных культур нейронов проводили в 12-луночных (или 24-луночных) планшетах в 6 параллелях для каждого варианта. Выживаемость культивируемых нейронов через 7 дней культивирования (7 DIV) оценивали путем подсчета цитохимически или иммуноцитохимически окрашенных клеток в 18 случайных полях каждой лунки. Холинергические нейроны выявляли с помощью окрашивания на ацетилхолинэстеразу. Культуры фиксировали 4% параформальдегидом 1 ч при комнатной температуре, промывали PBS и инкубировали 48 ч в 50 мМ ацетатном буфере (рН

5,0), содержащем 4 мМ ацетилхолин-йодид, 2 мМ CuSO_4 , 10 мМ глицин и 0,2 мМ этопропазин. Затем инкубационную среду отбирали, клетки промывали водой и на 1–2 мин. добавляли 1,25% раствор Na_2S . Среду отбирали и на 1–2 мин. добавляли 1% раствор AgNO_3 . Среду отбирали и планшеты промывали водой.

Общую популяцию нейронов выявляли с помощью антител к нейронспецифической энлазе (NSE) или MAP-2, белку, ассоциированному с микротрубочками (см. рис. 1). Клетки фиксировали 1 ч при комнатной температуре 4% параформальдегидом, промывали PBS, инкубировали 15 мин. в PBS, содержащем 33% овечьей сыворотки, и затем 1 ч в PBS, содержащем 0,3% Тритона X-100 и антитела кролика к NSE (разбавление 1:2000) или к MAP-2 (1 : 1000). Лунки промывали PBS, инкубировали 1 ч с биотинилированными антикроличьими антителами (разбавление в PBS 1 : 500) и окрашенные клетки выявляли с помощью ABC набора («Vectastain», США).

Определение уровня нейротрофического фактора мозга (BDNF). Для получения белковых экстрактов ткань взвешивали, помещали в буфер для экстракции, содержащий 100 мМ Трис-HCl (pH 7,7), 400 мМ NaCl, 0,4% Тритона X-100, 2% Block & Sample буфер из набора BDNF E_{max}[®] Immunoassay System («Promega», США), 1 мМ PMSF, 10 мкг/мл апротинина, 10 мкг/мл лейпептина, 1 мМ бензамидин, и диссоциировали пипетированием. Затем ткань гомогенизировали при 4 °С с помощью политрона (Tissue Tearor™, «Biospec products», США). Гомогенаты центрифугировали в течение 30 мин. при 4 °С при 15000 g, отбирали надосадочную жидкость и полученные экстракты хранили при -70 °С. Концентрацию белка в экстрактах определяли с помощью модифицированного метода Лоури [14].

Определение концентрации BDNF в экстрактах проводили с использованием набора BDNF E_{max}[®] Immunoassay System («Promega», США), следуя методике и рекомендациям фирмы-производителя.

Статистическая оценка результатов. Результаты обрабатывались с помощью программ Jandel Scientific SigmaPlot и Statsoft Statistica. Достоверности различий групповых средних оценивались с помощью дисперсионного анализа (one-way ANOVA и Kruskal-Wallis ANOVA). На графиках представлены средние значения групп с учетом стандартной ошибки среднего ($\text{Mean} \pm \text{SEM}$), n – объемы групп. Обозначения уровней значимости различий групповых средних: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Результаты

Для создания эффективной тест-системы, основанной на использовании клеточных культур, для отбора соединений, обладающих нейропротекторной активностью, были использованы первичные культуры нервных и глиальных клеток, полученных из мозга крысы. В качестве стандартного соединения использовали пептид Семакс (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro), являющийся аналогом фрагмента альфа-меланоцитстимулирующего гормона (α -MCTG) и обладающий известными и хорошо охарактеризованными нейропротекторными свойствами [2, 3], а также некоторые другие его гомологи.

Влияние Семакса на пролиферацию глии базальных ядер переднего мозга крысы in vitro. На первых этапах работы проверяли влияние тестируемых соединений на пролиферацию глиальных клеток. Данный тест позволял выявлять соединения с потенциальной канцерогенной активностью. В экспериментах был использован широкий диапазон концентраций пептида Семакс от 1 нМ до 10 мкМ. В качестве положительного контроля была использована ЭТС, которая содержит целый ряд факторов, стимулирующих пролиферацию клеток. Результаты проведенных экспериментов представлены на рисунке 3. Как видно из этого рисунка, нам не удалось обнаружить влияния Семакса на пролиферацию глии базальных ядер переднего мозга крысы в диапазоне использованных концентраций.

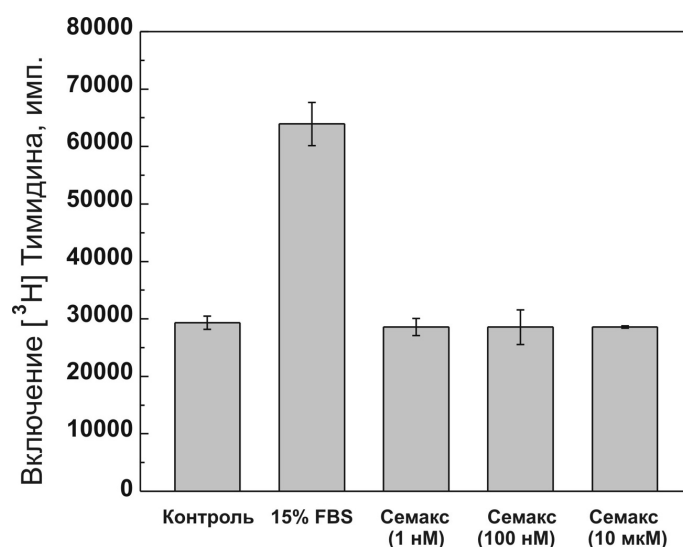


Рис. 3. Пролиферация глиальных клеток, полученных из базальных ядер переднего мозга крысы. Пролиферация глиальных клеток из мозга крысы в культуре в присутствии Семакса. FBS (ЭТС) – эмбриональная телячья сыворотка. $\text{Mean} \pm \text{SEM}$, n=4

Влияние Семакса и ряда других пептидов на выживаемость культивируемых нейронов in vitro. Изучение влияния Семакса на выживаемость нейронов в первичной культуре базальных ядер переднего мозга эмбрионов крысы (E16–17) проводили в условиях, исключающих клеточную пролиферацию и обеспечивающих жизнеспособность клеток в течение 2–3 недель. При этом в среде определенного состава в течение указанного выше времени происходила постепенная гибель нейронов, что представляло собой принципиальную возможность для выявления нейропротекторных или нейротоксических свойств исследуемых соединений.

Из результатов, представленных в таблице 1, видно, что Семакс при его однократном введении в культуру клеток в концентрациях 100 нМ и 10 мкМ в день посева примерно в 1,6 раза по сравнению с контролем увеличивает количество холинергических нейронов через 7 дней культивирования. В качестве положительного контроля использовали BDNF в концентрации 20 нг/мл, который, как известно, обладает способностью защищать нейроны головного мозга от гибели. Полученные данные указывают на существенное нейропротекторное действие данного пептида, которое было сравнимо с действием BDNF.

Таблица 1

Влияние Семакса и ряда пептидов на выживаемость нейронов базальных ядер переднего мозга крысы в культуре

Добавленные соединения	Контроль (без добавок)	Семакс (0,1 мкМ)	Семакс (10,0 мкМ)	АКТГ(4-7) (10,0 мкМ)	Нейротрофический фактор мозга (20 нг/мл)
Количество нейронов	110±16	165±20	176±21	108±15	183±23

Примечание: первичная культура нейронов, полученная из эмбрионов крысы (E17); 7 DIV, n=12, *p<0,05

Способность Семакса предотвращать гибель нейронов в первичных культурах позволила провести сравнение его эффективности с некоторыми другими пептидами, такими как АКТГ(4-10) и Pro-Gly-Pro-Семакс, у которого группировка Pro-Gly-Pro находилась и на N-конце пептидной молекулы. Полученные результаты указывают на то, что только Семакс наиболее эффективно предотвращал спонтанную гибель холинергических нейронов в нашей экспериментальной модели (данные не приведены).

Влияние Семакса на уровень нейротрофического фактора мозга в первичной культуре нейронов гиппокампа крысы. Обнаруженная нами способность Семакса увеличивать выживаемость, по меньшей мере, холинергических нейронов базальных ядер переднего мозга подтверждает его известные нейропротекторные свойства. С учетом полученных ранее результатов, а также известных физиологических и клинических эффектов Семакса нами было предположено, что Семакс, а, возможно, и другие соединения с нейропротекторными свойствами, способны осуществлять свое нейропротекторное действие через регуляцию экспрессии ряда нейротрофических факторов, в частности представителей семейства нейротрофинов.

В связи с этим были изучены эффекты пептида Семакс на уровень нейротрофического фактора мозга (BDNF) в первичных нейрональных культурах in vitro с помощью иммуноферментного анализа.

Из данных, приведенных на рисунке 4, видно, что Семакс в широком диапазоне концентраций в 1,5–2,0 раза увеличивал количество BDNF по сравнению с контролем. Причем наибольший эффект пептида проявлялся через 24 ч после его добавления к клеткам.

Эффекты данного пептида на экспрессию BDNF были специфичны, так как ряд других представителей пептидного семейства меланокортинов, такие как His-Phe-Pro-Gly-Pro, Met-Glu-His-Phe, Phe-Pro-Gly-Pro и Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly, достоверно не влияли на его уровень. Кроме того, смесь аминокислот, входящих в состав Семакса, также не обладала способностью увеличивать количество BDNF.

Обсуждение

Эксперименты, проведенные на первичных нейрональных и глиальных клеточных культурах, полученных из мозга крысы, показали перспективность данной модели для создания тест-системы, которая может быть

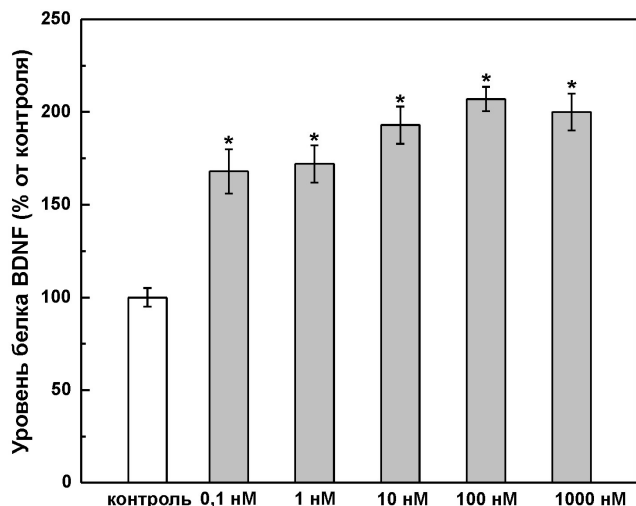


Рис. 4. Влияние различных концентраций Семакса на уровень BDNF в культуре нейронов гиппокампа крысы через 24 часа после введения пептида. Данные ИФА. Mean±SEM, n=4. Средний уровень BDNF в контроле составлял: 9,61 пг/100 тысяч клеток. $p < 0,05$

использована для скрининга соединений с нейропротекторной активностью. Было показано, что Семакс — пептид, известный своими нейропротекторными свойствами и применяемый в клинической практике, в частности для лечения инсульта, обладал способностью увеличивать жизнеспособность нейронов, полученных из мозга крыс, *in vitro*. Причем его эффекты были сравнимы с эффектами известного нейротрофического фактора BDNF. Интересным оказался факт, что Семакс в широком диапазоне

концентраций в 1,5–2,0 раза увеличивал количество BDNF по сравнению с контролем в используемых в экспериментах культурах клеток, причем эффекты данного пептида были специфичны.

Таким образом, созданный в результате проведенных экспериментов прототип тест-системы включает в себя использование двух типов клеток нервной системы: нейронов и клеток глии. Последовательность этапов тестирования химического соединения на нейропротекторную активность представлена на рисунке 5.

Скрининг соединений в такой тест-системе дает возможность оценить их нейропротекторный эффект не только на общей нейрональной популяции, но и на нейронах различной эргичности, а также по их способности предотвращать гибель клеток по пути некроза или апоптоза. Использование глиальных клеток позволяет оценить не только влияние тестируемых соединений на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток (что само по себе важно, учитывая, что количество глиальных клеток в мозгу млекопитающих примерно в 10 раз превышает количество нейронов), но и на способность потенциальных нейропротекторов стимулировать экспрессию нейротрофических факторов этими клетками. Поэтому, на наш взгляд, такая система скрининга соединений дает более полное представление о свойствах того или иного тестируемого соединения, что, в свою очередь, позволяет более эффективно проводить дальнейшее тестирование уже в экспериментах *in vivo* с перспективой разработки эффективных лекарственных препаратов.

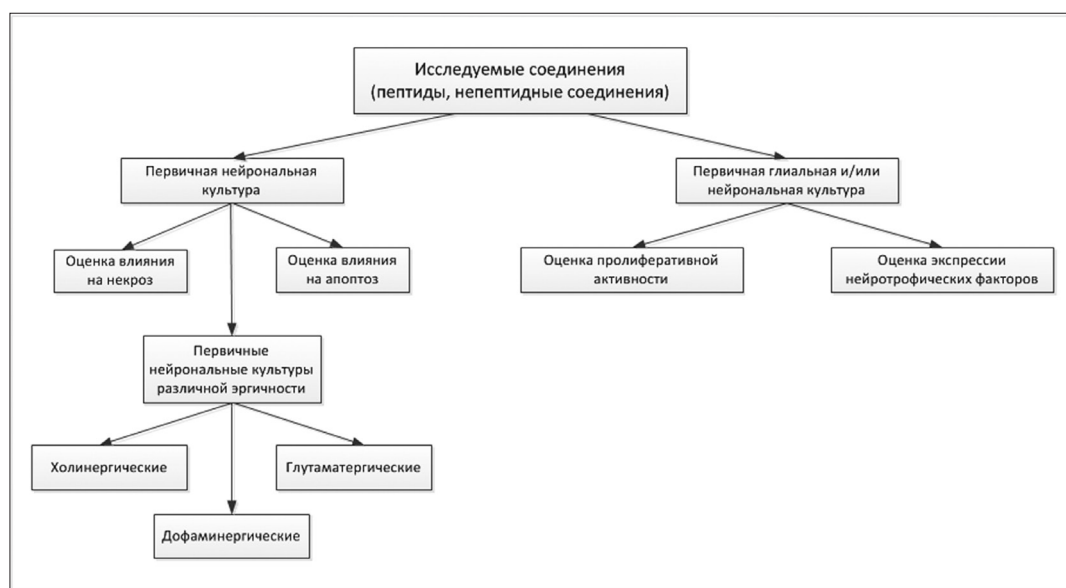


Рис. 5. Стратегия использования первичных клеточных культур нервной ткани для отбора соединений с нейропротекторной активностью

В перспективе целесообразно провести дополнительные исследования по адаптации данной системы к более широкому скринингу соединений и созданию ее более удобных модификаций. Так, можно будет заменить тест на пролиферацию клеток с использованием меченого тритием тимидина на тест с использованием специфических красителей, например, МТТ, что позволит отказаться от использования радиоактивности.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований удалось разработать систему для поиска и отбора соединений на нейропротекторную активность, основанную на использовании первичных нейрональных и глиальных клеточных культур, полученных из мозга крысы. Данная тест-система защищена патентом РФ № 2383615 от 10.03.2010 «Способ скрининга фармакологических соединений на нейропротекторную активность».

Уникальность разработанной тест-системы заключается не только в использовании при тестировании двух видов клеток (нейронов и глии), но и в оценке исследуемых соединений на способность стимулировать экспрессию защитных для клетки генов, в частности генов нейротрофинов, что дает дополнительную информацию о свойствах исследуемых соединений.

Применение предлагаемой тест-системы позволяет осуществлять ускоренный скрининг (порядка 1 месяца) большого количества соединений различной природы на наличие у них нейропротекторной активности, а также проводить выявление побочных активностей этих соединений, таких как, например, влияние на пролиферацию глиальных клеток.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования Института молекулярной генетики РАН «Центр клеточных и генных технологий» при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 14.740.11.0171 и ГК № 16.512.11.2103) и Российского фонда фундаментальных исследований грант №.10-04-01804.

Литература

1. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. — М.: Медицина, 2001. — 327 с.

2. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Мясоедов Н.Ф., Незавибатько В.Н., Журавлева Е.Ю., Ванчиккин А.В. Эффективность семакса в остром периоде полушарного ишемического инсульта (клиническое и электрофизиологическое исследование) // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 1997. — Т. 97. — С. 26—34.
3. Яковлева Е.В., Кузенков В.С., Федоров В.Н., Скворцова В.И., Кошелев В.Б., Гусев Е.И., Ашмарин И.П. Исследование эффективности семакса при глобальной ишемии мозга *in vivo* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1999. — Т. 127. — С. 172—174.
4. Christianson-Heiska I., Isomaa B. The use of primary hepatocytes from brown trout (*Salmo trutta lacustris*) and the fish cell lines RTH-149 and ZF-L for *in vitro* screening of (anti)estrogenic activity of wood extractives // *Toxicol. In Vitro*. — 2008 Apr. — Vol. 22(3). — P. 589—597. Epub 2007 Dec 7.
5. Cohen M.J., Kaufman S.R., Ruttenberg R., Fano A. A critical look at animal experimentation. — Medical Research Modernization Committee. — 1998. — P. 1—15.
6. Cole R. and de Vellis J. Preparation of astrocyte and oligodendrocyte cultures from primary rat glial cultures / In: Shahar A., de Vellis J., Vernadaris A., Haber B. (Eds.). *A Dissection and Tissue Culture Manual of the Nervous System*. — New York: Alan R. Liss, Inc., 1989. — P. 121—133.
7. Fano A. Lethal laws: animal testing, human health and environmental policy. — London, Zed Books, 1997. — P. 157—159.
8. Ha M.H., Ham S.Y., Lee D.H., Choi J. *In vitro* toxicity assay using human bronchial epithelial cell, Beas-2B, for the screening of toxicological risk of dioxin-like compounds sampled from small sized Korean waste incineration plants // *J. Chemosphere*. — 2007 Nov. — Vol. 70(1). — P. 20—28. Epub 2007 Sep 11.
9. Hefti F., Hartikka J., Sanchez-Ramos J. Dissociated cholinergic neurons of the basal forebrain in culture / In: Shahar A., de Vellis J., Vernadaris A., Haber B. (Eds.). *A Dissection and Tissue Culture Manual of the Nervous System*. — New York: Alan R. Liss, Inc., 1989. — P. 172—182.
10. Joos H., Albrecht W., Laufer S., Brenner R.E. Differential effects of p38MAP kinase inhibitors on the expression of inflammation-associated genes in primary, interleukin-1 β -stimulated human chondrocytes // *British Journal of Pharmacology* — 2010 Jul. — Vol. 160(5). — P. 1252—1262.
11. Landrigan P.J., Sonawane B., Butler R., Trasande L., Callan R., Droller D. Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life // *Environmental Health Perspectives*. — 2005. — Vol. 113(9). — P. 1230—1233.

12. Lewko M., Safar E., Birrer R. Advances in the treatment of dementia // *Pharmacy & Therapeutics*. – 2002. – Vol. 27(10). – P. 514–520.
13. McKenzie R., Fried M.W., Sallie R. et al. Hepatic failure and lactic acidosis due to fialuridine (FIAU), an investigational nucleoside analogue for chronic hepatitis B // *New England J. of Medicine*. – 1995. – Vol. 333. – P. 1099–1105.
14. Peterson G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable // *Anal. Biochem.* – 1977. – Vol. 83. – N 2. – P. 346–356.
15. Qu S., Liberda E.N., Qu Q., Chen L.C. In vitro assessment of the inflammatory response of respiratory endothelial cells exposed to particulate matter // *J. Toxicol. Environ. Health A*. – 2010 Jan. – Vol. 73(16). – P. 1113–1121.
16. Roberts P., Kitteringham N.R., and Park B.K. Species differences in the activation of mianserin to a cytotoxic metabolite // *Drug Metab. Dispos.* – 1991 July. – Vol. 19. – P. 841–843.
17. Shrivastava R. In vitro tests in pharmacotoxicology // *Alternatives to laboratory animals*. – 1997. – Vol. 25. – P. 339–340.
18. Wobus A.M., Loeser P. Present state and future perspectives of using pluripotent stem cells in toxicology research // *Archives of Toxicology* – 2011 Feb. – Vol. 85(2). – P. 77–78.

Список сокращений

ИФА – иммуноферментный анализ,
ПЦР – полимеразная цепная реакция,
ФРН – фактор роста нервов (Nerve Growth Factor – NGF),
ЦНС – центральная нервная система,
ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка (Fetal Bovine Serum – FBS),
BDNF – Brain-Derived Neurotrophic Factor (нейротрофический фактор мозга),
DIV – Day In Vitro (день в культуре),
E – «Э»: означает (вместе с последующей цифрой) день эмбриогенеза,
GFAP – Glial Fibrillary Acidic Protein (глиальный фибриллярный кислый белок),
MAP-2 – Microtubule-Associated Protein 2 (белок, ассоциированный с микротрубочками 2),
P – «П»: означает (вместе с последующей цифрой) постнатальный день,
PBS – Phosphate Buffered Saline (натрий-фосфатный буфер).

USING OF NEURONAL AND GLIAL PRIMARY CELL CULTURES OF MAMMALS FOR SCREENING OF THE COMPOUNDS ON NEUROPROTECTIVE ACTIVITY

I.A. GRIVENNIKOV, O.V. DOLOTOV, L.S. INOZEMTSEVA, S.A. ANTONOV,
A.G. KOBYLANSKI, N.F. MYASOEDOV

Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow

The prototype of the test system based on the use of neuronal and glial primary cell cultures is developed for search and selection of compounds with neuroprotective activity. Uniqueness of the developed test system consists not only in use at testing of two kinds of cells (neurons and glial cells), but also in an estimation of investigated compounds ability to stimulate an expression of protective genes for a cell, in particular genes of neurotrophins, such as BDNF that gives the additional information on the properties of these compounds. Application of this test system allows to carry out the accelerated screening (approximately 1 month) considerable quantity of compounds of the various nature on the presence of neuroprotective activity. In addition the information concerning some accessory effects of testing compounds, for example effect on proliferation, may be obtained.

Keywords: primary cultures, neurons, glial cells, neuroprotection, regulatory peptides, neurotrophins, proliferation.

ВЛИЯНИЕ ИОНОГЕННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ НА АКТИВНОСТЬ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ И АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Д.В. ТАРАБУКИН^{1*}, М.А. ТОРЛОПОВ², В.В. ВОЛОДИН¹

¹ Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН,

² Институт химии КНЦ Уральского отделения РАН, Сыктывкар, Республика Коми

Изучено влияние добавок производных целлюлозы, инулина и хитозана, содержащих сульфатные группы и аминогруппы, а также дополнительно — гидрофобные заместители, карбоксильные и оксиэтильные группы, на активность целлюлолитических и амилолитических ферментов. Показано, что фермент-ингибирующая способность таких полимеров в целом растет с увеличением содержания ионогенных групп в элементарном звене. Ингибирующий эффект также зависит от природы полисахаридной цепи и содержания дополнительных неионогенных групп.

Ключевые слова: сульфатированные полисахариды, аминоксодержащие полисахариды, целлюлазы, амилазы, ферментативный гидролиз, ингибирующий эффект.

Введение

Ионогенные полисахариды (ИП) различного строения имеют исключительно широкое распространение в природе. Как анионные, так и катионные ИП выполняют многочисленные функции в живых организмах [6, 9]. Одним из механизмов активности ИП в живых системах является их способность к многоточечному кооперативному взаимодействию с белками, интегрированными в клеточные мембраны, факторами свертываемости крови, ферментами.

Для синтеза аналогов природных ИП могут быть использованы методы химической модификации неионогенных полисахаридов, таких как целлюлоза, декстран, крахмал [13]. Их производные, включающие амино- и сульфатные группы, обладают значительной биологической активностью, перспективны как антикоагулянты крови [8, 10] и сорбенты тяжелых металлов [11]. Некоторые полусинтетические ИП оказывали выраженное антимикробное, противовирусное и иммуномодулирующее действие [12, 15].

Ранее нами было показано ингибирующее влияние полусинтетических аминополисахаридов — хитоза-

на, его производных — на процесс гидролиза крахмала эндоамилазами, входящими в состав ферментного препарата Амилоsubтилин ГЗх, и экзоамилазами препарата Глюкаваморин ГЗх [4]. Ингибирование активности ферментов, по нашему предположению, связано с образованием полиэлектролитных комплексов между заряженной цепью ИП и ферментами, макромолекулы которых представляют собой полиамфолиты, что согласуется с имеющимися данными о влиянии полиэлектролитов на конформацию и активность ферментов в растворах [3]. Кроме того, значение этих исследований связано с открывающейся возможностью использования ИП для избирательной регуляции углеводного обмена у различных организмов.

Цель настоящей работы заключается в изучении влияния сульфатированных и аминоксодержащих ИП, полученных химической модификацией целлюлозы и хитозана, на активность целлюлаз и амилаз при ферментативном гидролизе соответственно целлюлозы и крахмала.

Материалы и методы

В работе были использованы: хлопковая микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ производства АО «Полиэкс», г. Бийск) с молекулярной массой — $MM=36 \cdot 10^3$, вискозиметрическое определение в кадоксене [1], индекс кристалличности 0,88; хитозан пищевой (ЗАО «Биопрогресс») со степенью деацетилирования 0,82 и $MM=200 \cdot 10^3$; инулин (MP medicals), $MM=5000$.

ИК-спектры изучаемых соединений получали на ИК-Фурье спектрометре MIR-8000 (ORIEL) в

© 2011 г. Тарабукин Д.В., Торлопов М.А., Володин В.В.

* Автор для переписки:

Тарабукин Дмитрий Валерьянович,
к.б.н., н.с., Институт биологии Коми научного центра
Уральского отделения РАН
167982, Республика Коми, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28
Тел. (8212) 436828
E-mail: DVTarabukin@ib.komisc.ru

таблетках КВг. ЯМР ^{13}C спектры получены на приборе Bruker-300; 15000 накоплений, время релаксации 3,5 с. Элементный анализ образцов модифицированных полисахаридов осуществляли на приборе EA-1110 фирмы «CE instruments».

Источником амилаз служили ферментные препараты отечественного производства (Сиббиофарм): Амилосубтилин ГЗх (α -амилазная активность 600 ед./г) и Глюкаваморин ГЗх (глюкоамилазная активность 400 ед./г). Источником целлюлаз являлся препарат Целлолюкс-Ф той же фирмы (целлюлазная активность 2000 ед./г).

В качестве субстрата для амилаз использовался крахмал растворимый, марки ч.д.а. в количестве 100 мг на 10 см³ дистиллированной воды. Раствор крахмала перед введением ферментных препаратов и дезоксиаминополисахаридов активировали кипячением в течение 5 мин., затем охлаждали. Субстратом для целлюлаз служила хлопковая МКЦ в количестве 50 мг на 10 см³ 0,01 М ацетатного буфера (рН 4,7).

Ферментативный гидролиз крахмала и МКЦ проводили при 50 °С в закрытых бюксах. Растворы ферментных препаратов перед введением в реакционный объем пропускали через микропористую мембрану с диаметром пор 0,2 мкм. Содержание препарата Амилосубтилин ГЗх в реакционной среде составляло 0,333% от массы крахмала, препарата Глюкаваморин ГЗх – 1% от массы крахмала, препарата Целлолюкс-Ф – 2% от массы МКЦ. Массовое содержание ионогенного полисахарида в реакционной среде составляло 1% от массы крахмала и 2% – от массы МКЦ.

Влияние ИП на ферментативный гидролиз крахмала и МКЦ оценивали по накоплению восстанавливающих сахаров (ВС) в реакционном объеме в динамике. Содержание ВС определяли по методу Шомоди – Нельсона [2].

Получение ИП и их характеристика. Сульфатированные (анионные) полисахариды. Сульфат целлюлозы (СЦ) получали методом сульфатирования целлюлозы комплексом пиридин- SO_3 , подробно описанным в работе [5]. Нами исследованы образцы со степенью сульфатирования 0,8 и 1,4, соответственно обозначенные как СЦ-0,8 и СЦ-1,4. ИК: 1240 см⁻¹ ν (S=O); 810 см⁻¹ ν_{bc} (C-OS); 3400 см⁻¹ ν_{ac} (OH). ЯМР ^{13}C (D_2O) δ , м.д. (I, Гц): 100,8 (C₁), 79,2 (C₂-OSO₃-), 78,1, 75,1 и 73,3 (C₃-C₅), 66,7 (C₆-OSO₃-).

Сульфат карбоксиметилцеллюлозы (СКМЦ) получали сульфатированием карбоксиметилцеллюлозы хлорсульфоновой кислотой в ДМФА по методу [3].

ИК (КВг): 1626 см⁻¹ (ν_{COO}), 1240 см⁻¹ (ν_{SO_2}), 814 см⁻¹ (ν_{SO}). ЯМР ^{13}C (D_2O) δ , м.д. (I, Гц) 61,6 (C₆), 75,3 (C₅), 79,8 (C₄), 76,1 (C₃), 74,7 (C₂), 102,8 (C₁), 71,8 (CH₂ при C₆), 72,8 и 68,1 (C-2S и C-6S), 179,3 (C=O).

Сульфат тритилцеллюлозы (СТЦ) получали сульфатированием 6-О-тритилцеллюлозы комплексом пиридин- SO_3 в ДМФА при 60 °С. Полученный полимер осаждали ацетоном, промывали этиловым спиртом, обрабатывали раствором NaOH и очищали методом диализа. ИК (КВг): 3061 ν_{ac} (OH), 1489 см⁻¹; 1261 см⁻¹, 810 см⁻¹ ν_{bc} (C-OS); 767 см⁻¹. ЯМР ^{13}C (D_2O) δ , м.д. (I, Гц) 59,83 (C₆), 72–80 (C₂-C₅), 100,84 (C₁), 141,22–147,28 (Ar).

Сульфат инулина (СИ) получали сульфатированием инулина комплексом пиридин- SO_3 в ДМФА при 25 °С. Полученный полимер осаждали ацетоном, промывали этиловым спиртом, обрабатывали раствором NaOH и очищали. ИК (КВг): 3404 ν (OH), 2096 см⁻¹ (CH₂); 1165 см⁻¹ (ν_{SO_2}); 817 см⁻¹ ν_{bc} (C-OS). ЯМР ^{13}C (D_2O) δ , м.д. (I, Гц) 61,66, 75,02, 77,73, 81,70, 103,84.

Характеристики сульфатированных полисахаридов приведены в таблице 1.

Аминосодержащие полисахариды. Водорастворимый солянокислый хитозан (ХТ) получали обработкой исходного хитозана 10%-ным раствором концентрированной соляной кислоты в этаноле. Полимер отделяли, промывали этанолом до нейтральной реакции и сушили при 60 °С в вакууме. ИК-спектр в (КВг) ν_{max} см⁻¹: 3439, 3363 (OH, NH₂), 2873 (CH₂), 1658, 1595 (амид I, II). ЯМР-спектр (^{13}C , D_2O): δ 56,4 (C₂), 60,6 (C₆), 70,2–76,9 (C₃-C₄), 98,0 (C₁), 175,2 (C=O).

Сульфат хитозана (СХТ) синтезировали обработкой соли толуолсульфокислоты и ХТ аминсульфоновой кислотой в ДМФА. ИК-спектр в (КВг) ν_{max} см⁻¹: 3602, 2968, 1631, 1143 (S-O), 813 (C-OS). ЯМР-спектр (^{13}C , D_2O): δ 57,3 (C₂), 67,1 (C₆-OSO₃-), 73,1–78,7 (C₃-C₄), 103,1 (C₁), 167,2 (C=O).

Карбоксиметилхитозан (КМХТ) синтезировали по методу [7]. Полученную натриевую соль КМХТ обрабатывали 10%-ным раствором концентрированной соляной кислоты в этаноле. Полимер отделяли, промывали водным этанолом до нейтральной реакции и сушили при 60 °С в вакууме. КМХТ содержит остаток гликолевой кислоты, более слабой, чем серная.

Этот тип амфолитного производного хитозана использован нами в виде солянокислой соли, карбоксильная группа которой представлена в свободном виде.

Таблица 1

**Сульфатированные полисахариды
и их характеристика**

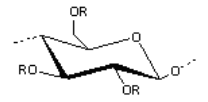
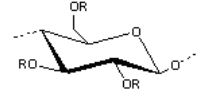
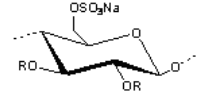
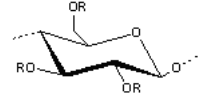
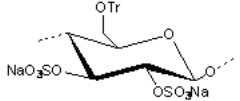
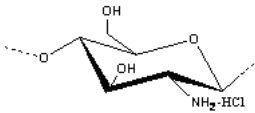
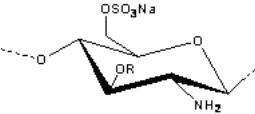
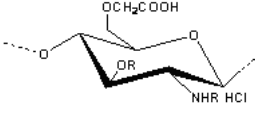
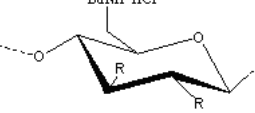
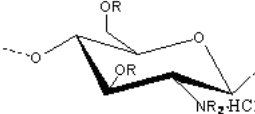
Анионный полисахарид	Основное структурное звено	Заместитель, R	Степень замещения
СЦ-0,8		H, SO ₃ Na	0,8
СЦ-1,4		H, SO ₃ Na	1,4
СКМЦ		CH ₂ COONa, SO ₃ Na	CH ₂ COONa – 1,1, SO ₃ Na – 2,0
СТЦ		–	SO ₃ Na – 2,0
СИ		–	3,0

Таблица 2

**Аминосодержащие полисахариды
и их характеристика**

Аминополисахарид, индекс	Исходный полисахарид	Основное структурное звено	Заместитель R	Степень замещения
ХТ	Хитозан		-	0,8
СХТ	Хитозан		H, SO ₃ Na	SO ₃ Na – 1,1 NH ₂ – 0,8
КМХТ	Хитозан		H, CH ₂ COOH	COOH – 1,1 NH ₂ – 0,8
АБЦЛ	Целлюлоза		OH, NHBu	1,2
ОЭХТ	Хитозан		H, (CH ₂ CH ₂ O) _n где n=8–10	M ₃ (CH ₂ CH ₂ O) ^{-5,3} NH ₂ – 0,8

ИК-спектр в (КВг) ν_{\max} см⁻¹: 1734 (СОО⁻), 1651, 1563 и 1317 см⁻¹ (амид I, II, III). ЯМР-спектр (¹³С, D₂O): δ 48,6 (N-CH₂-), 57,1 (C₂), 61,2 (C₆), 71,6 (C₆-O-CH₂-), 72,8–77,1 (C₃-C₄), 101,0 (C₁), 170,4 (N-,C=O), 175,2(C=O).

Дезоксиаминобутилцеллюлозу (АБЦЛ) синтезировали из тозилата целлюлозы. Метод: тозилат целлюлозы растворяли в ДМФА, после чего прибавляли пятикратный (в расчете на полисахаридное звено) избыток бутиламина и выдерживали смесь при температуре 90 °С в течение 48 ч. Полимер осаждали этанолом, промывали этанолом, затем ацетоном. Солянокислую соль АБЦЛ получали способом, описанным выше для ХТ. Полученный продукт имел следующие характеристики: ИК-спектр в (КВг) ν_{\max} см⁻¹: 2954, (R₂NH), 1597 (NH), сл. 770–816 (деформ. колебания C-H связи ароматического кольца), сл. 1359, 1175 см⁻¹ (SO₂-O). ЯМР-спектр (¹³С, DMSO d₆): δ 13,98, 20,01, 38,6–40,3, 73,8, 98,9, 102,5, 126–130,2.

Оксиэтилированный хитозан (ОЭХТ) получали обработкой хитозана этиленоксидом в присутствии триэтиламина. Полимер осаждали этанолом, промывали этанолом, затем ацетоном. Солянокислую соль ОЭХТ получали способом, описанным выше для ХТ. ИК-спектр в (КВг) ν_{\max} см⁻¹: 3407, 3363 (ОН, NH₂) 2928, 2872 (CH₂), 1662, 1598 (амид I, II), 1102.

Характеристики аминокислотных полисахаридов представлены в таблице 2.

Результаты и обсуждение

В результате воздействия эндоамилаз препарата Амилосубтилин ГЗх на крахмал без добавок сульфатированных производных целлюлозы происходит быстрая деполимеризация макромолекул крахмала и ускоренное накопление ВС в реакционной среде (рис. 1). Однако процесс гидролиза фактически выходит на стационарный уровень после 1 часа гидролиза, вероятно, вследствие недостаточного количества фермента, способного расщеплять 1,6- α -связи крахмала. Как видно из рисунка 1, наличие в реакционной среде сульфатированных полисахаридов в различной степени влияет на процесс накопления продуктов гидролиза крахмала под действием эндоамилаз, причем, как и в случае гидролиза без добавок ИП, кривая накопления ВС выходит на стационарный уровень приблизительно после 30 мин. от начала процесса.

Наибольшая ингибирующая способность наблюдается при введении СТЦ — производного целлюлозы,

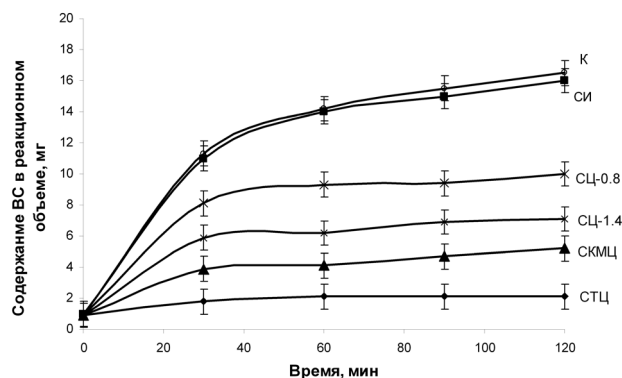


Рис. 1. Накопление продуктов гидролиза крахмала под воздействием эндоамилаз препарата Амилосубтилин ГЗх в присутствии сульфатированных ИП

содержащего сульфатные группы при 2 и 3 углеродных атомах элементарного звена и объемный гидрофобный заместитель (третильную группу) при шестом углеродном атоме. В данном случае отмечается практически полное отсутствие накопления продуктов гидролиза. Наименьшую ингибирующую активность по отношению к эндоамилазам среди сульфатированных полисахаридов проявил препарат СИ. В группе СЦ более высокую ингибирующую активность показал препарат с более высокой степенью замещения (СЦ-1,4). Высокой ингибирующей активностью отличается СКМЦ. Таким образом, внутри группы сульфатированных производных целлюлозы наблюдается увеличение ингибирующей активности по отношению к эндоамилазам препарата Амилосубтилин с увеличением содержания сульфатных групп. Хотя СИ обладает наиболее высокой степенью сульфатирования из представленных полисахаридов, его самая низкая ингибирующая активность может объясняться тем, что, в отличие от производных целлюлозы, полимерная цепь которых построена из остатков глюкозы, цепь СИ состоит из остатков фруктозы. Отсюда с большой долей вероятности можно заключить, что именно различие в строении исходной полимерной цепи приводит к различию ингибирующих свойств среди одинаковым образом функционализированных полисахаридов.

Добавка сульфатированных полисахаридов оказывает значительно меньшее влияние на накопление продуктов гидролиза крахмала, чем в случае эндоамилаз препарата Амилосубтилин (рис. 2). Кривые накопления ВС при использовании глюкаваморина ГЗх имеют более пологий вид ввиду того, что преобладающий фермент глюкоамилаза при незначительной эндоамилазной активности в препарате обеспечивает постоянную скорость накопления продуктов гидролиза за весь период реакции.

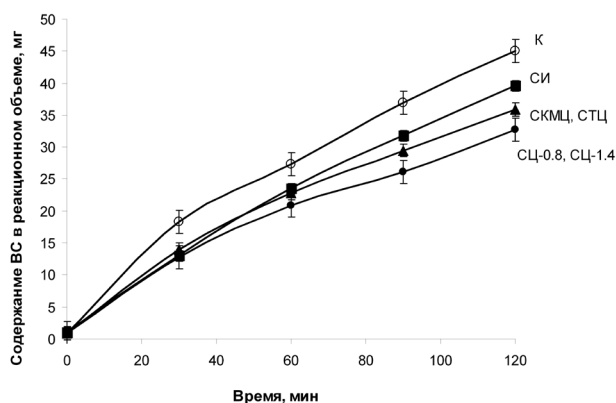


Рис. 2. Накопление продуктов гидролиза крахмала под воздействием экзоамилаз препарата Глюкаваморин ГЗх в присутствии сульфатированных ИП

Расположение сульфатированных полисахаридов в ряду активности ингибирования несколько отличается от предыдущего случая. Наибольшей ингибирующей активностью отличается СЦ, причем препараты со степенью замещения 0,8 и 1,4 демонстрируют равные активности. Наименее ингибирующая активность выражена для СИ. Препараты сульфатированной целлюлозы, содержащие, в отличие от СЦ, дополнительные функциональные группы (карбоксиметильные для СКМЦ и тритильные для СТЦ), располагаются в середине этого ряда (см. рис. 2). Следовательно, при добавлении сульфатированных полисахаридов к субстрату, гидролизуемому препаратом Глюкаваморин ГЗх, ингибирующая активность не зависит от степени сульфатирования, в отличие от подавления процесса гидролиза крахмала эндоамилазами препарата Амилосубтилин ГЗх, а определяется структурой полисахарида, в частности, присутствием дополнительных функциональных групп, то есть зависит от способности максимально приблизить заряженные сульфатные группы к блокируемым участкам аминокислотной последовательности фермента. В этом случае строение цепи полисахарида или наличие экранирующих сульфатных групп и не участвующих в электростатическом взаимодействии дополнительных групп (см. СТЦ, СКМЦ) определяют снижение ингибирующей способности.

Наибольшую ингибирующую способность в отношении целлюлаз проявили ХТ и его оксиэтилированное производное — ОЭХТ (рис. 3). В то же время более низкая активность ОЭХТ, вероятно, связана с наличием в его макромолекуле олигомеров ПЭГ, препятствующих пространственному сближению с аминокислотной цепью фермента [1]. Меньшую в сравнении с ХТ и ОЭХТ ингибирующую активность проявляют КМХТ и АБЦЛ. Последний полисахарид отличается тем, что

был получен на основе целлюлозы. Наименьшую активность проявляет СХТ. Это производное хитозана имеет в своей структуре как сульфатные (анионные) группы, так и аминогруппы (катионные), то есть относится к классу полиамфолитов. К этому же классу принадлежит и КМХТ, анионные группы которого представлены остатками карбоновых кислот. На примере СХТ и КМХТ можно сделать вывод, что введение в молекулу аминопроизводного дополнительных электроотрицательных групп уменьшает способность полимера влиять на гидролиз МКЦ, причем в случае СХТ влияние наименее выражено и характер накопления продуктов гидролиза в реакционной среде при наличии данного соединения в целом сходен с гидролизом без добавления ИП (см. контроль, рис. 3). Как было указано в нашей предыдущей работе [4], различия в ингибирующей способности между СХТ и КМХТ могут быть вызваны разницей в отрицательном заряде макромолекул этих производных. При одинаковой природе полимерного остова и сходных степенях замещения СХТ содержит остаток более сильно диссоциирующей группы, что предполагает большее по сравнению с КМХТ экранирование положительно заряженных аминогрупп самого ИП.

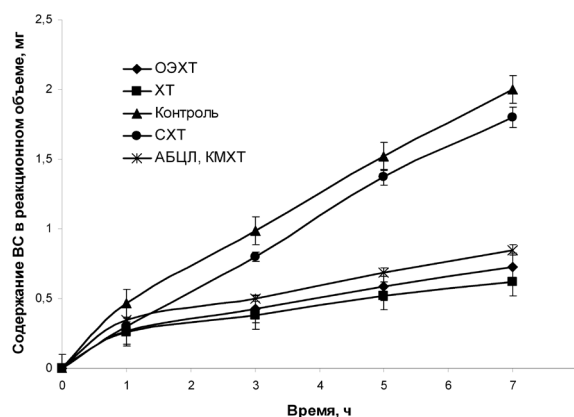


Рис. 3. Накопление продуктов гидролиза МКЦ под воздействием целлюлазного комплекса препарата Целлолюкс-Ф в присутствии добавок аминополисахаридов

Оценка влияния сульфатированных полисахаридов на процесс ферментативного гидролиза целлюлозного субстрата представлена на рисунке 4.

Данные ИП располагаются в следующей последовательности по возрастанию ингибирующей активности: СЦ, СКМЦ, СТЦ. Отметим, что по возрастанию ингибирующей активности сульфатированные полисахариды расположены здесь в схожей последовательности, как и в случае гидролиза крахмала под воздействием эндоамилаз

препарата Амилосубтилин ГЗх (см. рис. 1), то есть для сульфатированных производных целлюлозы наблюдается увеличение ингибирующей активности по отношению к процессу гидролиза МКЦ препаратом Целлолюкс-Ф с увеличением содержания сульфатных групп. Ингибирующие активности СЦ-0,8 и СЦ-1,4 в случае гидролиза целлюлозного материала, в отличие от их ингибирующей активности при гидролизе крахмала эндоамилазами препарата Амилосубтилин ГЗх, фактически одинаковы. Кроме того, при добавлении всех испытанных препаратов ИП полного прекращения процесса ферментативного гидролиза МКЦ в выбранных условиях не наблюдается.

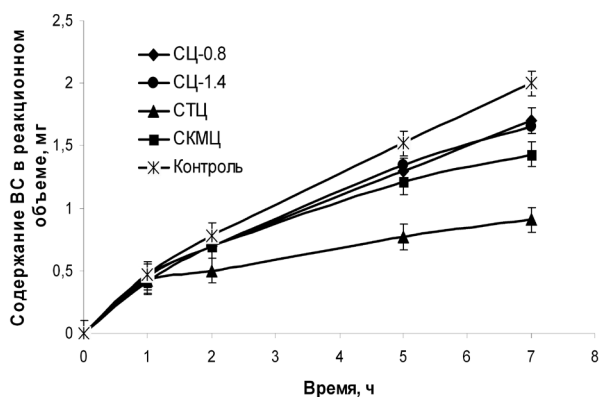


Рис. 4. Накопление продуктов гидролиза МКЦ под воздействием целлюлозного комплекса препарата Целлолюкс-Ф в присутствии добавок сульфатированных ИП

Обобщая результаты воздействия анионных ИП на процессы ферментативного гидролиза растительных полисахаридов, следует подчеркнуть, что сульфатированные производные целлюлозы с более высокой степенью сульфатирования при введении в систему субстрат-фермент проявляют наибольшую ингибиторную активность. Наиболее универсальным ингибитором из использованных в данной работе сульфатированных полисахаридов является СТЦ. Этот полимер практически полностью ингибировал процесс гидролиза крахмала под воздействием эндоамилаз препарата Амилосубтилин ГЗх и проявлял сравнительно высокую ингибиторную активность в остальных случаях. Похожую универсальность, но с несколько меньшей активностью обнаруживал препарат СКМЦ. Препараты СЦ, являясь наилучшими из представленных анионных ИП ингибиторами экзоамилаз препарата Глюкаваморин ГЗх, в остальных случаях сильно уступают в ингибиторной активности препаратам-лидерам, вероятно, вследствие меньшей степени сульфатирования (см. табл. 1). Это согласуется и с

результатами нашей предыдущей работы [4] и работами других авторов [14] о том, что ингибирующая способность ИП связана с образованием электростатических связей между положительно заряженными цепями полисахаридов и противоположно заряженными участками аминокислотной последовательности ферментов. Такое электростатическое взаимодействие приводит к нарушению пространственно-упорядоченной структуры фермента и к потере им вследствие этого активности по отношению к субстрату.

Анализируя данные по влиянию аминокислотных ИП на ферментативный гидролиз крахмала препаратами Амилосубтилин ГЗх и Глюкаваморин ГЗх [4], а также МКЦ, можно сделать вывод, что среди аминокислотных ИП препараты ХТ и АБЦЛ проявляют наиболее универсальную, то есть в наименьшей степени зависящую от типа субстрата и ферментного препарата ингибирующую активность. Полиамфолиты — КМХТ и СХТ — проявляют сравнительно низкую ингибирующую активность, за исключением гидролиза крахмала экзоамилазами препарата Глюкаваморин ГЗх [4]. Из этого, а также вышеприведенных обобщений по ингибирующей активности сульфатированных ИП можно сделать вывод, что ингибирование ферментов препаратами Амилосубтилин ГЗх и Целлолюкс-Ф заряженными полимерами имеет сходный механизм. Ингибирующая активность ИП в этих случаях, при прочих равных условиях возрастает с увеличением содержания заряженных групп в моносахаридном остатке. Поскольку для экзоамилаз препарата Глюкаваморин ГЗх подобной зависимости не получено, можно предположить, что активные центры этих ферментов являются труднодоступными для ИП.

Заключение

Таким образом, показано, что ИП ингибируют процесс ферментативного расщепления природных полисахаридов (крахмала и целлюлозы). При этом ингибирующий эффект зависит, прежде всего, от природы и плотности боковых заряженных функциональных групп, а также полисахаридной основы ИП. Полученный результат можно объяснить образованием интерполимерных комплексов между цепями ИП и участками аминокислотных последовательностей ферментов, что приводит к нарушению нативной структуры и, как следствие этого, снижению активности последних. В целом ингибирующая активность возрастает с увеличением плотности ионогенных групп в моносахаридных звеньях ИП.

Практическое использование полученных результатов перспективно, прежде всего, в биотехнологических процессах микробиологического синтеза целлюлолитических и амилолитических ферментов, а также для создания новых физиологически активных полимеров.

Литература

1. Болотникова Л.С., Данилов С.Н., Самсонова Т.И. Метод определения вязкости и степени полимеризации целлюлозы // ЖПХ. — 1966. — № 1. — С. 176–180.
2. Польшалина Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов. — М.: ДеЛи принт, 2003. — С. 321.
3. Сабурова Е.А., Бобрешова М.Е., Елфимова Л.И. Ингибиторное действие полиэлектролитов на олигомерные ферменты // Биохимия. — 2000. — Т. 65. — № 8. — С. 1151–1161.
4. Тарабукин Д.В., Торлопов М.А. Влияние хитозана и его производных на деградацию крахмала под действием амилаз // Вестник биотехнологии и физико-хим. биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2010. — Т. 6. — № 2. — С. 23–27.
5. Торлопов М.А., Демин В.А. Сульфатированные и карбоксиметилированные производные микрокристаллической целлюлозы. // Химия растительного сырья. — 2007. — № 4. — С. 55–61.
6. Усов А.И. Проблемы и достижения в структурном анализе сульфатированных полисахаридов красных водорослей // Химия растительного сырья. — 2001. — № 2. — С. 7–20.
7. Casettari L., Vllasaliu D., Mantovani G. Effect of PEGylation on the toxicity and permeability enhancement of chitosan // Biomacromolecules. — 2010. — № 11. — P. 2854–2865.
8. Chaidedgumjorn A., Toyoda H., Woo E. Effect of (1,3) and (1,4)-linkages of fully sulfated polysaccharides on their anticoagulant activity // Carbohydrate Research. — 2002. — Vol. 337. — P. 925–933.
9. Fukuda C., Kollmar O. Anionic polysaccharides a class of substances with hepatoprotective and antiadhesive properties in rat liver preservation // Transpl. Int. — 2002. — Vol. 15. — P. 17–23.
10. Groth Th., Wagenknecht W. Anticoagulant potential of regioselective derivatized cellulose // Biomaterials. — 2001. — N 22. — P. 2719–2729.
11. Hamdy A. Biosorption of heavy metals by marine algae // Current Microbiology. — 2000. — Vol. 41. — P. 232–238.
12. Matsuda M., Shigeta S., Okutani K. Antiviral activities of marine pseudomonas polysaccharides and their oversulfated derivatives // Mar. Biotechnol. — 1999. — Vol. 1. — P. 68–73.
13. Richter A., Wagenknecht W. Synthesis of amylose acetates and amylose sulfates with high structural uniformity // Carbohydrate Research. — 2003. — Vol. 338. — P. 1397–1401.
14. Saburova E.A., Tikhonenko S.A., Dybovskaya Yu.N. and Sukhorukov B.I. Changes in the activity and structure of urease in the interaction with polyelectrolytes // Russian J. of Physical Chemistry. — 2008. — Vol. 82. — N 3. — P. 468–474.
15. Vishu Kumar B.A., Varadaraj M.C., Tharanathan R.N. Low molecular weight chitosans preparation with the aid of pepsin, characterization, and its bactericidal activity // Biomacromolecules. — 2007. — N 8. — P. 566–572.

Список сокращений

АБЦЛ — дезоксиаминобутилцеллюлоза,
 ВС — восстанавливающие сахара,
 ИП — ионогенные полисахариды,
 КМХТ — карбоксиметилхитозан,
 МКЦ — микрокристаллическая целлюлоза,
 ОЭХТ — оксиэтилированный хитозан,
 СКМЦ — сульфат карбоксиметилцеллюлозы,
 СТЦ — сульфат тритилцеллюлозы,
 СХТ — сульфат хитозана,
 ЦЦ — сульфат целлюлозы,
 ХТ — хитозан.

EFFECT OF IONOGENIC POLYSACCHARIDES ON THE ACTIVITY OF CELLULOLYTIC AND AMYLOLYTIC ENZYMES

D.V. TARABUKIN¹, M.A. TORLOPOV², V.V. VOLODIN¹

¹ Institute of Biology, Komi Scientific Center, Ural Branch RAS,

² Institute of Chemistry KSC Ural Branch RAS, Syktyvkar, Komi Republic

The effect of supplementation of cellulose derivatives, inulin and chitosan containing sulfate groups and amino groups, as well as additional supplementation — hydrophobic substituents, carboxylic and hydroxyethyl groups on the activity of cellulolytic and amylolytic enzymes. It is shown that the enzyme-inhibiting ability of such polymers generally increases with increasing content of ionic groups in the elementary link. The inhibitory effect also depends on the nature of the polysaccharide chain and provide for additional non- ionogenic groups.

Keywords: sulfated polysaccharides, amino polysaccharides, cellulases, amylases, enzymatic hydrolysis, inhibitory effect.

ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ФУКОИДАНА И АЛЬГИНАТА КАЛЬЦИЯ ИЗ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

Л.Х. ВАФИНА*

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ФГУП «ВНИРО»), Москва

Подобраны способы экстрагирования, очистки, сушки фукоидана из фукусовых и ламинариевых водорослей. Перспектива их использования широка: выделение полисахаридов (альгинат, фукоидан), маннита, получение биологически активных экстрактов, а также производство биотоплива.

Ключевые слова: бурые водоросли, биотехнология, фукоидан, альгинат, биологически активные вещества, биотопливо.

В прибрежной зоне российских морей сосредоточены промысловые запасы водорослей-макрофитов, которые возобновляются, но мало используются в России.

Водоросли — это не только продукты питания, но и источники полисахаридов, применяемых в пищевой промышленности, медицине, фармацевтике, микробиологии, в текстильном, бумажном, кожевенном производствах и многих других. Водоросли содержат комплекс биоактивных веществ и представляют собой ценный источник жизненно необходимых микронутриентов. Поэтому их применяют для увеличения биологической ценности пищевых продуктов.

Непищевые водоросли используют в качестве удобрений, добавляют в корм скоту и птице, что приводит к улучшению воспроизводства животных. Кроме того, водоросли — это потенциальный источник биотоплива (биодизель, биоэтанол), эксперименты по получению которого в мире приобрели широкое распространение. Следовательно, водорослевые ресурсы являются частью сырьевой, продовольственной и фармацевтической безопасности страны [5].

В настоящее время в материалах общих допустимых уловов (ОДУ) обоснована цифра промыслового

запаса бурых водорослей около 1,5 млн. т сырой массы. Согласно данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН — ФАО (2007), в 2005 году в Российской Федерации добыто 47,5 тыс. т бурых водорослей (около 17% ОДУ) [3]. В то же время Россией осуществляется активная закупка импортных бурых водорослей, гидроколлоидов, используемых различными отраслями промышленности и медициной.

То есть фактически при значительных собственных запасах высококачественных морских водорослей российские производители продукции предпочитают покупать импортируемое в страну сырье. Между тем запасы промысловых водорослей морей России и их производство методом марикультуры способны обеспечить этим сырьем не только нашу страну, но и потребности внешнего рынка [4].

Практически неиспользуемым сырьем являются фукусовые водоросли, которые в основном применяют в качестве сырья для производства кормовых добавок и удобрений почвы в сельском хозяйстве как компонент косметических средств и для производства технического альгината. Технологий производства пищевых продуктов из фукусовых водорослей пока нет, хотя в их составе содержатся те же ценные компоненты, что и в ламинариевых, применение которых гораздо шире.

Для всех бурых водорослей характерен биосинтез сульфатированных полисахаридов — фукоиданов: биополимеров, проявляющих антикоагулянтную, противовирусную, противоязвенную, антитромбиновую, противовоспалительную, противоопухолевую, антипролиферативную, антиоксидантную и другие активности [4].

В связи с тем, что фукусовые водоросли содержат на порядок больше фукоиданов, чем ламинариевые [4],

© 2011 г. Вафина Л.Х.

* **Автор для переписки:**

Вафина Лилия Хаматовна

к.т.н., заведующий лабораторией аналитического и нормативного обеспечения качества и безопасности,

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии,

107140 Москва, ул. Верхняя Красносельская, 17

Тел.: (499) 264-41-21

E-mail: vafinavnir@mail.ru

целесообразно перед выделением альгинатов экстрагировать из них фукоидан.

Кроме того, бурые водоросли, содержащие альгинат и его соли, — это перспективное сырье для приготовления пищевых продуктов с заданными реологическими свойствами, биологически активных добавок, косметической продукции, энтеросорбентов и т.д.

Морские бурые водоросли содержат также йод, микроэлементы и аминокислоты, которые полезны для организма человека, и, очевидно, при обработке сушеных водорослей водой можно получать экстракты с высоким регулируемым содержанием йода, минеральных и азотистых веществ.

Задача обеспечения постоянно растущих потребностей экономики в энергии обуславливает необходимость развития возобновляемой энергетики и, в частности, биоэнергетики. Это также аргументировано необходимостью решения глобальных проблем, связанных с ограниченностью природных запасов топлива и обеспечением экологической безопасности.

Биомасса водорослей, аккумулирующая в себе солнечную энергию в форме углеводов растительного происхождения, может служить исходным сырьем для выработки биотоплива в твердом, жидком и газообразном виде в зависимости от технологии переработки. Сейчас в мире распространены следующие виды биотоплива: биогаз, биоэтанол, биодизель и твердое биотопливо [1]. Морские водоросли в связи с содержанием в них липидов и углеводов также могут быть сырьем для производства биотоплива. С этой целью целесообразно использовать или непригодные водоросли, или отходы глубокой переработки пищевых (водорослевые остатки — ВО).

Таким образом, очевидно, что водоросли можно применять не только в качестве пищевого, лекарственного сырья и сырья для производства биологически активных веществ (БАВ) и гидроколлоидов, но и в производстве биотоплива — биодизеля и биоэтанола.

Одно из важных направлений государственной политики Российской Федерации — обеспечение населения качественными и безопасными продуктами питания (Федеральный закон «О качестве и безопасности пищевых продуктов» от 02.01.2000 г. № 29-ФЗ). Поэтому контроль над безопасностью сырья, полуфабрикатов и готовых продуктов — это обязательная мера обеспечения безопасности производимой продукции.

В связи с вышеуказанным было проведено настоящее исследование, в котором изучались потенциальные возможности бурых водорослей для создания перспективной биотехнологической продукции.

Материалы и методы

В работе исследовали бурые водоросли: *Fucus vesiculosus* (Баренцево море, май 2008 г.), *Ascophyllum nodosum* (Баренцево море, май 2008 г.), *Sargassum polycystum* (Желтое море, 2009 г.), *Sargassum macclurey* (Желтое море, 2009 г.), *Sargassum oligocystum* (Желтое море, 2009 г.), *Laminaria saccharina* (Баренцево море, май 2008 г.); водорослевые экстракты (в сухом и жидком виде) из *Fucus vesiculosus*, *Laminaria saccharina*. Изучали также *Sargassum swartzii* и *Turbinaria ornata*.

Были использованы общепринятые химические, физические, органолептические, микробиологические и математические методы.

Определение показателей безопасности проводили в соответствии со следующими документами:

- для КМАФАнМ — с ГОСТ 10444.15-94;
- для БГКП (колиформы) — с ГОСТ 30518-97;
- для патогенных организмов, в т.ч. *Salmonellae* — с ГОСТ 30519-97;
- для плесени — с ГОСТ 10444.12-88;
- содержание тяжелых металлов (кадмий, свинец) — с ГОСТ 30178-96;
- содержание мышьяка — с ГОСТ 26930-86;
- содержание ртути — с ГОСТ 26927-86.

Содержание влаги, золы, альгиновой кислоты и йода определяли в соответствии с ГОСТ 26185-84.

Содержание белка определяли по методу Кьельдаля с применением автоанализатора шведской фирмы FOSS Analytical AB, модель FOSS 2300. Содержание фукоидана и альгината в водорослях определяли спектрофотометрическим методом. Вязкость водорослевых остатков измеряли методом вискозиметрии с использованием вискозиметра Брукфелда.

Результаты и обсуждение

Нами проведены исследования по показателям безопасности исследуемых видов бурых водорослей порядка *Fucales* (табл. 1, 2).

Полученные данные показали соответствие образцов, заготовленных в РФ, требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01, а образцы, заготовленные в прибрежной зоне Желтого моря (Социалистическая Республика Вьетнам), не соответствуют требованиям, что говорит о загрязнении мест произрастания или несоблюдении правил сбора и сушки заготовителем.

Результаты исследований химического состава фукусковых водорослей представлены в таблице 3.

Таблица 1

Микробиологические показатели бурых водорослей порядка *Fucales*

Наименование образца	Исследуемые показатели				
	КМАФАнМ, КОЕ/1 г	В каком количестве не обнаружены			Дрожжи и плесени не более, КОЕ/1 г
		БГКП	<i>Staphylococcus aureus</i>	Патогенные, в т.ч. <i>Salmonella</i> и <i>L. monocit</i>	
<i>F. vesiculosus</i>	$1,5 \times 10^2$	1,0	0,1	25	не обн.
<i>A. nodosum</i>	$<15 \times 10^1$	1,0	0,1	25	не обн.
<i>S. polycystum</i>	$5,0 \times 10^4$	1,0	0,1	25	2×10^3
<i>S. macclurey</i>	$1,1 \times 10^3$	1,0	0,1	25	$4,0 \times 10^2$
<i>S. oligocystum</i>	$2,0 \times 10^2$	1,0	0,1	25	$1,0 \times 10^2$
Допустимые нормы мг/кг (СанПиН 2.3.2.1078-01) (масса продукта (г) в которой не допускается)	5×10^4	0,1	1,0	25	Не более 100 КОЕ/г

Таблица 2

Содержание тяжелых металлов в бурых водорослях порядка *Fucales*

Наименование образца	Содержание, не более мг/кг			
	Кадмий	Свинец	Мышьяк	Ртуть
<i>S. polycystum</i>	0,008	0,037	0,497	0,012
<i>F. vesiculosus</i>	0,439	-	2,300	следы
<i>A. nodosum</i>	0,181	-	2,800	следы
<i>S. macclurey</i>	0,023	0,038	3,2801	0,016
<i>S. oligocystum</i>	0,015	0,027	12,579	0,011
Допустимые нормы мг/кг (СанПиН 2.3.2.1078-01) (масса продукта (г) в которой не допускается)	1,0	5,0	5,0	0,1

Таблица 3

Химический состав фукусовых водорослей

Содержание, г/100 г водорослей	<i>F. vesiculosus</i>	<i>A. nodosum</i>	<i>S. polycystum</i>	<i>S. macclurey</i>	<i>S. oligocystum</i>
	Белое море и Баренцево море		Желтое море		
Азотистые вещества	4,91	4,66	3,93	7,53	4,90
Липиды	0,62	0,72	-	-	-
Минеральные вещества	22,8	19,3	36,5	30,8	29,3
Йод	0,02	0,05	-	-	-
Альгиновая кислота	15,4	26,6	20,94	40,00	27,33
Маннит	5,3	3,5	0,53	0,81	3,24
Фукоидан	14,4	10,2	2,88	0,90	3,40
Ламинаран	3,4	2,4	0,56	0,30	0,74

Было продемонстрировано, что минеральных веществ в фукусовых водорослях тропических морей больше, чем в фукоидах морей России. Содержание таких биологически активных веществ, как фукоидан, ламинаран, маннит, в водорослях Баренцева моря на порядок выше, чем в водорослях Желтого моря. Незначительное содержание биоактивных компонентов (фукоидан, ламинаран, маннит) может сдерживать получение из них БАД, но это полностью не исключает их использование в различных отраслях промышленности.

С другой стороны, водоросли, собранные в прибрежной зоне Желтого моря, по показателям безопасности не отвечают требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01, и поэтому их не рекомендуется использовать для приготовления пищевых продуктов. Для получения качественного и безопасного по микробиологическим и другим показателям водорослевого сырья необходимо разработать условия добычи, предварительной обработки и консервирования водорослей, но возможно их использование при приготовлении биотоплива.

Фукусовые водоросли являются полноценным источником фукоидана. Поэтому из *Sargassum polycystum* (Желтое море, 2009 г.) и смеси водорослей (*S. polycystum*, *S. macclurey*, *S. oligocystum*), приготовленной в равных пропорциях, экстрагировали фукоидан по следующей схеме: биомассу водорослей обрабатывали раствором формалина, раствором соляной кислоты; затем центрифугировали, полученный фильтрат высушивали, получали сухой фукоидан в виде порошка бежевого цвета, без запаха.

Химический состав полученных полисахаридов приведен в таблице 4.

Таблица 4

Химический состав фукоиданов, г/100 г продукта

Компонент	Фукоидан из смеси саргассовых водорослей	Фукоидан из <i>S. polycystum</i>
	Содержание в г/100 г продукта	
Рамноза	1,05	1,31
Фукоза	12,71	19,54
Ксилоза	2,69	2,51
Манноза	2,11	2,65
Глюкоза	1,68	1,91
Галактоза	8,48	10,51
Уроновые кислоты	15,10	17,70
SO ₃ Na	16,50	18,10

Достаточно высокое содержание галактозы, ксилозы и уроновых кислот в препаратах фукоиданов свидетельствует о том, что сульфатированный полисахарид этих водорослей представляет собой сложные по составу гетерополимеры, в которых фукоза не является единственным главным компонентом. Эта особенность состава сульфатированных полисахаридов саргассовых водорослей описана в литературе на примере других видов водорослей этого семейства. Содержание ламинарана, которое оценивают по глюкозе, невелико и, возможно, образуется за счет восстановления глюкуроновой кислоты. Обнаружение маннозы в некоторой степени объясняется тем, что эти препараты содержат маннит, но и тем, что манноза также может являться компонентом сложных молекул фукоиданов.

С практической точки зрения препаративного получения фукоиданов можно использовать смесь фукусовых водорослей при условии, что видовые различия между сульфатированными полисахаридами незначительны.

После выделения фукоидана из бурых водорослей *S. macclurey* проводили их обработку для получения альгината натрия и альгината кальция по следующей методике. Биомассу водорослей обрабатывают раствором формалина, раствором соляной кислоты, затем проводят термообработку при рН 8,5–9,0, отделяют концентрат центрифугированием, проводят осаждение альгиновой кислоты раствором хлорида натрия и обесцвечивание полученной альгиновой кислоты раствором перекиси водорода, обезвоживание этиловым спиртом и сушат в установке сублимационного высушивания.

Известно, что практически ценные свойства альгиновых кислот определяются их молекулярной массой и соотношением двух мономеров, остатков маннуровой (М) и гулуровой (G) кислот и характером их распределения вдоль линейной цепи полимеров.

Реологические свойства альгинатов, выделенных из *S. polycystum*, *S. macclurey*, *S. oligocystum*, были определены методом вискозиметрии. Определение относительной вязкости 0,2%-ных растворов альгинатов показало, что исходные образцы альгинатов обладали вязкостью в пределах от 2,7; 5,3 до 7,7 Па с для каждого вида водоросли, соответственно, что отвечает их молекулярной массе: 38±5,0; 62±8,0; 88±8,0. После однократной обработки альгинатов 10%-ным раствором перекиси водорода, которую проводили с целью их обесцвечивания, реологические свойства альгината изменялись вследствие снижения вязкости 0,2%-ных водных растворов на 10–15% от исходной. Определены мономерный и блочный состав альгинатов, которые представлены в таблице 5.

Таблица 5

Мономерный и блочный состав альгинатов

Образец	M/G	M-блоки+ G-блоки, %	Соотношение M-блоки/ G-блоки
Альгинат кальция, один раз обрабо- танный перекисью водорода	0,67	61	0,56
Альгинат кальция, дважды обрабо- танный перекисью водорода	0,70	63	0,60

Как видно из данных таблицы 5, в альгинате из *S. macclurey* содержание гулурановой кислоты превосходит содержание маннурановой кислоты, что очень ценно с практической точки зрения. В то же время надо отметить, что химическая обработка этого альгината с целью получения бесцветного препарата приводит к некоторой потере МG-блоков в пользу маннурановой кислоты.

Выделение водорастворимых компонентов из бурых водорослей *Fucus vesiculosus*, *Laminaria saccharina* проводили методом экстрагирования водой, затем пастеризовали полученный экстракт, который потом лиофильно высушивали.

Экстракты в жидком виде представляют собой прозрачную жидкость бурого цвета со специфическим водорослевым запахом, сладковато-солонятым вкусом. Экстракты из ламинариевых водорослей имеют более светлый цвет, чем экстракт из фукусковых.

Порошки из экстрактов кремово-коричневого цвета с запахом карамели, сладковато-солонятого вкуса.

Результаты исследований содержания нейтральных сахаров показали, что их сравнительно немного, главным из них является 6-атомный сахароспирт маннит (табл. 6).

Содержание фукоидана (удвоенное количество фукозы) больше в экстрактах из фукусковых водорослей, содержание ламинарана (судят по глюкозе) также наибольшее в фукусковых экстрактах. Методика анализа не позволяет отличить маннозу от маннита, но наиболее высокие значения в графе «манноза + маннит» обусловлены высоким содержанием маннита, обычным компонентом биомассы бурых водорослей. Маннита больше содержится в экстракте из ламинариевых. Содержание альгината практически одинаково в обоих образцах.

Минеральный состав экстрактов бурых водорослей приведен в таблице 7.

Таблица 6

Химический состав экстрактов из бурых водорослей, г/100 г сухого вещества

Компонент	Ламинариевый экстракт	Фукусковый экстракт
	Содержание в % от сухого вещества	
Содержание сухих веществ, в том числе:	0,53–0,60	2,9
белок (N×6,25)	0,075	8,0
зола	47,0	1,81
фукоидан	4,88	5,7
йод	0,40	$0,9 \times 10^{-3}$
альгинат натрия	3,93	3,96
Сумма нейтральных моносахаридов, в том числе:	53,76	31,52
рамноза	0,20	-
фукоза	2,44	2,82
ксилоза	0,53	0,08
(манноза+маннит) маннит	46,3	22,45
глюкоза	0,90	5,98
галактоза	3,39	0,19

Таблица 7

Минеральный состав экстрактов из бурых водорослей, мг/100 мл продукта

Наименование элемента	Ламинариевый экстракт	Фукусковый экстракт	АНП*, мг/сут.
Марганец	6,4	2,1	2,0
Железо	1,05	0,35	15,0
Кобальт	0,008	0,002	0,01
Медь	0,375	0,125	1,0
Цинк	5,7	1,9	12,0
Магний	2,0	0,6	400,0
Кальций	3,0	1,0	1250,0
Калий	160,0	53,0	2500,0
Натрий	19,2	6,4	2400,0
Йод	2,6	0,9	0,15

Примечание: *АНП – адекватная норма потребления ФАО/ВОЗ, мг/сут.

Таким образом, подобраны способы экстрагирования, очистки, сушки фукоидана из фукусовых и ламинариевых водорослей.

После выделения биологически активных веществ из биомассы водорослей остается значительное количество водорослевого остатка, который тоже содержит БАВ водорослей, но в меньшем количестве. Сравнительный анализ химического состава водорослей и ВО показывает, что при выделении полисахаридов из биомассы водорослей уменьшается количество азотистых веществ. Известно, что часть азотистых веществ водорослей находится в растворенном состоянии. Однако в *S. macclurey* эти изменения незначительны, что, возможно, связано с тем, что в составе этих водорослей азотистые вещества находятся не в свободном, а в связанном состоянии. Содержание минеральных веществ

в остатках водорослей несколько увеличивалось, что может быть связано с изменением баланса веществ в тканях водорослей, так как основной углеводный компонент, содержание которого иногда превышает 50%, был экстрагирован (табл. 8).

ВО содержат некоторое остаточное количество альгината, который придает им вязкость. В связи с этим их можно применять в качестве основы для приготовления косметических средств. Тем более, что речь идет о фукусовых водорослях, характеризующихся высоким содержанием фукоидана, который, как известно, имеет антиопухолевые свойства и благотворно влияет на кожу человека. Поэтому нами были проведены исследования реологических свойств водорослевых остатков методом вискозиметрии (табл. 9). Как уже указывалось, измерения проводились на вискозиметре Брукфелда.

Таблица 8

Химический состав водорослевых остатков фукусовых водорослей после экстрагирования альгината

Наименование веществ	<i>F. vesiculosus</i>	<i>S. swartzii</i>	<i>S. polycystum</i>	<i>S. macclurey</i>	<i>T. ornata</i>
	Содержание, г/100 г сухого вещества				
Азотистые	3,60	3,10	3,20	9,20	2,90
Минеральные	15,90	18,90	16,90	13,50	14,30
Альгинаты	2,5	4,5	20,94	20,8	6,8
Фукоидан	5,4	3,8	3,12	2,4	1,4

Таблица 9

Реологические показатели водорослевых остатков из фукусовых водорослей после экстрагирования альгината

Исследуемый образец	Номер шпинделя	Скорость вращения, об./мин.	Вязкость ВО	
			сПз	Па с
ВО <i>F. vesiculosus</i>	S 62	60	301	0,3
ВО <i>S. swartzii</i>	S 64		3783	3,8
ВО <i>S. polycystum</i>	S 64		5767	5,8
ВО <i>S. macclurey</i>	S 64		7037	7,1
ВО <i>T. ornata</i>	S 95		3647	3,7
Водорослевый гель из фукуса			-	80–160

Водорослевый гель, приготовленный из фукусовых водорослей без выделения альгината, имеет вязкость от 80 до 160 Па с в зависимости от вида водоросли и условий предобработки. Следовательно, после выделения альгината из водоросли вязкость снижается значительно, но некоторая часть этого полисахарида все же остается в водорослевом остатке, что и обуславливает образование вязкой структуры.

Таким образом, водорослевые остатки из фукусовых водорослей после выделения полисахаридов целесообразно использовать в качестве структурообразующего компонента косметической продукции вследствие достаточно высокого содержания альгината, а также в качестве защиты кожи от поражающего действия ультрафиолетовых лучей и для лечения злокачественных новообразований вследствие наличия в ВО фукоидана, обладающего антиопухолевым, противовоспалительным действием. Гелеобразующая система водорослевого остатка хорошо сочетается со многими водо- и жирорастворимыми биологически активными веществами, применяемыми для оздоровления, омоложения, увеличения тургора кожи.

Кроме того, ВО и водоросли, не относящиеся к пищевым (например, саргасы, цистозира), можно использовать при производстве биотоплива. Россия имеет достаточную по протяженности береговую линию со значительным количеством морей, озер, болот и т.д., в отличие от других стран. Видовое разнообразие водорослей составляет для бурых примерно 85 видов [3]. Запасы фукусовых водорослей северных морей (Белое море и Баренцево море) оцениваются примерно в 80 тыс. тонн [3], Черного моря — в 85 тыс. тонн (для цистозиры). Промысел фукусовых водорослей в Российской Федерации почти не ведется; цистозиру в Черном море не добывают, а в северных морях в 2008 году изъята их незначительная часть — примерно 50 тонн фукусовых водорослей (Карелия, Архангельская область). Это говорит о неиспользовании фукусовых водорослей, а они могут быть ценным сырьем для биотехнологического производства и получения биотоплива. Наиболее рационально использовать для этой цели остатки водорослей после выделения из них биологически ценных компонентов — фукоидана, альгината, ламинарана и маннита.

С учетом запасов фукусовых водорослей северных морей и Черного моря можно оценить размер возможного общего допустимого улова этих водорослей. Как правило, ОДУ оценивают примерно в 10% от запасов, в связи с чем получается: для Баренцева и Белого морей примерно

8 тыс. тонн; а для Черного моря (цистозира) — приблизительно 8,5–9,5 тыс. тонн.

Остатки водорослей после выделения биокomпонентов составляют примерно 25–27% от массы исходного сырья, в связи с чем расчетное количество остатков, которые могут образовываться при переработке 8 тыс. тонн фукусовых водорослей (ОДУ), — примерно 2,2 тыс. тонн, выход биотоплива из которых может составить около 1,1 тыс. тонн. При использовании 9,0 тыс. тонн цистозиры (ОДУ) для производства биодизеля, по теоретическим расчетам, выход его должен составить около 4,5 тыс. Таким образом, при переработке фукусовых водорослей Белого, Баренцева и Черного морей можно в год получать около 5,6 тыс. тонн биотоплива.

Существуют различные технологии производства биоэтанола: ферментативный (масса разлагается с помощью микроорганизмов или энзимов), сухой и мокрый метод, но при использовании любой технологии необходима обязательная предварительная стадия — гидролиз, при котором происходит разрыв химических связей молекулярной цепи целлюлозы, превращающий их в молекулы простых сахаров, которые затем и подвергаются процессам ферментации и дистилляции. При этом существуют два основных способа гидролиза: химический и ферментативный. Ферментативный гидролиз имеет очень важный недостаток: высокая стоимость и низкая продуктивность энзимов.

Заключение

Таким образом, исследования показали, что фукусовые водоросли в России практически не используются при наличии значительных запасов в прибрежных зонах российских морей. Перспектива их использования широка — это выделение полисахаридов (альгинат, фукоидан), маннита, получение биологически активных экстрактов, а также производство биотоплива. Проблеме биотоплива в последнее время уделяют пристальное внимание, а водоросли или ВО могут быть перспективным сырьем для его получения, без каких-то дополнительных затрат по выращиванию, как, например, со злаковыми культурами, для которых требуются посевные площади, уход в процессе роста, уборка, транспортирование и т.д. Разработка технологий производства биотоплива, в том числе биоэтанола, из отходов от переработки водорослей и внедрение их в промышленность позволят эффективно использовать сырьевые запасы страны, повысить ее экономический потенциал, а также обеспечить недорогим, экологически чистым биотопливом.

Литература

1. Антифеев В.Н. Альтернативные источники энергии для автомобилей // Автомобильный транспорт. — 2002. — № 3. — С. 43–47.
2. Вафина Л.Х., Подкорытова А.В. Фукусовые и ламинариевые водоросли — основа для получения функциональных продуктов питания / Известия ТИНРО. Т. 156. — Владивосток, Изд. Центр ФГУП «ТИНРО-центр», 2009. — С. 348–357.
3. Вилкова О.Ю. Проблемы изучения и освоения промысловых водорослей морей России / Тезисы докладов Третьей Международной научно-практической конференции «Морские прибрежные экосистемы. Водоросли, беспозвоночные и продукты их переработки». Владивосток, 8–10 сентября 2008 г.
4. Подкорытова А.В. Лечебно-профилактические продукты и биологически активные добавки из бурых водорослей // Рыбное хозяйство. — 2001. — № 1. — С. 51–52.
5. Подкорытова А.В., Вилкова О.Ю. Проблемы и перспективы освоения водорослевых ресурсов морей России / Материалы Второй Международной научно-практической конференции «Повышение эффективности использования водно-биологических ресурсов». Москва, ВВЦ, 26–27 ноября 2008.

Список сокращений

БАВ — биологически активные вещества,
 БАД — биологически активные добавки,
 ВО — водорослевые остатки,
 ОДУ — общий допустимый улов.

PRODUCTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE FUCOIDAN AND CALCIUM ALGINATE FROM BROWN ALGAE

L.H. VAFINA

*All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography (Federal State Unitary Enterprise «VNIRO»),
 Moscow*

Chosen methods of extraction, purification and drying of fucoidan laminaria and fucales algae. The prospect of their use is wide: a selection of polysaccharides (alginate, fucoidan), mannitol, obtaining biologically active extracts, as well as the production of biofuels.

Keywords: brown algae, biotechnology, fucoidan, alginate, biologically active substances, biofuels.

ПОЛУЧЕНИЕ НОВОГО ОБРАЗЦА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ДИЕТИЧЕСКОГО ПИТАНИЯ И ИЗУЧЕНИЕ ПРОЯВЛЯЕМОЙ ИМ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Ю.С. ДУНАЕВСКАЯ¹, О.В. ЛУКИН^{1*}, Н.М. ШУСТРОВА², С.О. ЛУКИН¹

¹ *Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,*

² *НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалея РАМН, Москва*

В статье представлены сведения о получении образцов нового йогуртоподобного пробиотического продукта, приготовленного на соевом экстракте (молоке). Изложена информация об использованных для этой цели штаммах лакто- и бифидобактерий. Приведены данные о бактерицидной активности продукта.

Ключевые слова: дисбактериоз, пробиотики, соевые продукты, диетическое питание.

Согласно определению, дисбактериоз (дисбиоз) — это любые количественные или качественные изменения типичного для данного биотипа нормофлоры человека и животных, возникающие в результате воздействия на макро- и микроорганизм различных факторов экзогенного и эндогенного характера, влекущие за собой выраженные клинические проявления со стороны макроорганизма или представляющие собой следствие патологических процессов в организме [1].

По наблюдениям отечественных специалистов, дисбактериоз кишечника отмечается у 87% больных хроническим колитом, 90–92% больных острыми бактериальными кишечными заболеваниями, 97,3% взрослых больных ротавирусным гастроэнтеритом, 73% больных туберкулезом, 95,3% больных реактивными артритами, у 80% лиц, профессионально занятых в производстве антибиотиков, 98,7% больных после лаважа желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [2, 9, 12].

Нормальная микрофлора кишечника играет важную роль в организме хозяина, выполняя барьерную функцию, стимулируя перистальтику, иммунную систему кишечника и соответственно повышение специфической и неспецифической защиты всего организма, обеспечивает питательными веществами слизистую оболочку толстой кишки и снабжает макроорганизм определенными витаминами [5–7].

Адекватное, сбалансированное питание при нормальном функционировании органов и систем предотвращает развитие дисбиозов. При изменениях микрофлоры необходима коррекция питания с учетом моторики, секреторных изменений ЖКТ, ферментативной активности пищеварительного тракта и с дополнительным введением витаминно-минеральных комплексов. В настоящее время широкое распространение получает функциональное питание [4], которое подразумевает ежедневное применение продуктов, оказывающих благоприятное действие на макроорганизм.

Широкое распространение получили бактериальные препараты на основе микроорганизмов, представителей нормальной микрофлоры — пробиотики. В настоящее время появилось новое понятие — биотерапевтические агенты (БТА), представляющие собой препараты микроорганизмов, на основе штаммов лактобифидобактерий, способных выживать в кислой среде, эффективно прикрепляться к эпителиоцитам, осуществлять колонизацию слизистой, продуцировать антимикробные субстанции — бактериоцины [3, 13], стимулировать иммунную систему, предупреждать избыточный рост и размножение патогенных микроорганизмов, восстанавливать нормальную микрофлору [8].

Использование соевого молока для приготовления йогуртоподобного продукта обусловлено тем, что соевые продукты питания содержат полноценные белки, практически не уступающие по питательности и пищевой ценности белкам животного происхождения, комплекс биологически активных компонентов (клетчатка, кальций, железо, цинк, магний и др.) и ряд витаминов (В, D, E) при отсутствии холестерина и молочного сахара

(лактозы) [10]. Все соевые продукты сбалансированы по калорийности и содержанию основных питательных веществ (все незаменимые аминокислоты) [11] и хорошо усваиваются человеческим организмом. Низкий уровень насыщенных жиров и отсутствие холестерина обеспечивают преимущество соевого молока перед традиционным животным, а при наличии пищевой аллергии на животные белки соевые продукты становятся единственной возможной альтернативой традиционной пище.

Поэтому актуально создание образца функционального диетического питания, нового препарата пробиотика на основе соевого молока, содержащего лактобактерии и бифидобактерии, перспективные для коррекции микрофлоры ЖКТ.

Целью настоящей работы является изучение антагонистической активности в отношении к условно патогенным и патогенным микроорганизмам образцов соевого йогуртоподобного продукта, содержащего лактобактерии и бифидобактерии.

Для исследований были выбраны бифидобактерии — *B. bifidum* из препарата «Биовестин» и лактобациллы — *Lactobacillus* из кумыса башкирского и шубата казахского. Образцы функционального диетического питания — живых йогуртов, готовили на соевом молоке, предоставленном фирмой «Фармбиоал». Исследования проводились в соответствии с требованиями СанПин 2.3.2.1078-01 с использованием методик, приведенных в ГОСТах: 10444.11-89, 30518-97, 10444.2-94, 10444.8-8830510-97, 10444.12-88.

Бактерицидное (бактериостатическое) действие лактобактерий (из препарата «Наринэ» и кумыса) и молочнокислого стрептококка изучали в отношении золотистого стафилококка, кишечной палочки и кишечной палочки с гемолитическими свойствами, а также *B. subtilis*, выделенной из аптечного препарата «Бактисубтил». В качестве контрольного штамма брали лактобациллы из аптечного препарата «Лактобактерин».

Для выяснения бактерицидного (бактериостатического) действия применяли суточные культуры микроорганизмов (стафилококка, кишечных палочек и бацилл) в количестве 10^8 КОЕ/мл.

Культуры молочнокислой палочки и стрептококка для опыта готовили непосредственно из полученных образцов таким образом, чтобы в 1 мл испытуемого раствора было 10^6 или 10^8 КОЕ (колониеобразующих) клеток микроорганизмов.

Подсчет количества лактобацилл или стрептококка осуществляли титрованием с высевом на плотную питательную среду MRS (фирма «Хаймедиа», Индия).

Учет результатов осуществляли через 24–26 часов термостатирования при температуре 37 °С.

Исследуемые микроорганизмы также титровали методом десятикратных серийных разведений с высевом на плотные питательные среды.

В работе использовали питательные среды производства предприятий России (г. Оболенск), фирм «BioMerieux» (Франция), «Hi Media» (Индия) и «Serva» (Германия):

- среда эндо — для культивирования кишечной палочки;
- стафилококковый агар — для золотистого стафилококка;
- 5% кровяной агар — для бацилл и определения гемолитических свойств бактерий;
- MRS agar — для лактобацилл.

В бактериологические пробирки вносили по 1 мл исследуемого микроорганизма и молочнокислых микроорганизмов, закрывали герметично латексными пробками и помещали в термостат на 48 часов.

После инкубирования мерными (0,01 мл) одноразовыми петлями проводили высевы на соответствующие питательные среды и среду MRS для количественного учета микроорганизмов.

Для выделения чистых культур лактобацилл было взято 5 образцов кисломолочного напитка «Кумыс». Чистую культуру *Lactobacillus* получали последовательным пересевом из плотной питательной среды MRS в жидкую питательную среду MRS, а затем снова на плотную питательную среду MRS.

Идентификация выделенных микроорганизмов осуществлялась с помощью биохимической идентификационной системы «API 20А». В результате было выделено два вида микроорганизмов: *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus acidophilus*.

Выбор штамма лактобактерий для дальнейшего культивирования и исследования был проведен на основе данных об их антагонистической активности. Ингибирующую активность определяли методом перпендикулярных штрихов на плотной питательной среде в чашках Петри по отношению к следующим тест-культурам условно патогенных и патогенных микроорганизмов: *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*.

Суточные культуры лактобактерий, а также бифидобактерий или образцы йогуртоподобного продукта наносили прямой полосой с помощью петли (2

мм) на поверхность плотной питательной среды MRS агар в центре чашки Петри. Инкубирование посевов осуществляли в течение 3 суток при 37 °С. Затем к выросшей культуре подсеивали тест-культуры, петлей 1 мм перпендикулярно зоне роста анализируемой культуры, не касаясь ее.

После суточной инкубации чашек при 37 °С определяли зоны угнетения роста тест-культур. Для контроля роста тест-культур использовали их аналогичный, параллельный посев в чашках Петри с той же плотной средой, но без полосы испытуемых лактобактерий, бифидобактерий или йогуртоподобного продукта. Антагонистическую активность штаммов лактобактерий определяли методом отсроченного антагонизма [11] по отношению к: *C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*.

Для приготовления йогуртоподобного продукта использовали соевое молоко с массовой долей сухих веществ 10,5%, массовой долей жира 1,5%, массовой долей белка 2,5% и кислотностью 80 град. Т.

Из образцов кумысов и шубата выделили 4 вида лактобактерий: *Lactobacillus fermentum*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* и *L. casey*. Как правило, лактофлора была представлена одним видом лактобактерий.

Первичный скрининг выделенных штаммов лактобактерий, который проводили методом перпендикулярных штрихов на плотной питательной среде, показал, что они отличаются по ингибирующей способности. Зоны отсутствия роста тест-культур определили у различных штаммов: для *E. coli* — от 5 до 48 мм, для *S. aureus* — от 0 до 32 мм, для *B. subtilis* — от 8 до 37 мм, для *C. albicans* — от 0 до 31 мм, для *P. aeruginosae* — от 0 до 28 мм, для *Shigella sonnei* — от 10 до 52 мм, *Shigella flexneri* — от 0 до 42 мм, *K. pneumoniae* — от 10 до 57 мм.

Сравнительный анализ результатов совместного культивирования гемолитической кишечной палочки, золотистого стафилококка, *B. subtilis* с молочнокислыми лактобациллами убедительно показал, что обычно используемые для производства кисло-молочных продуктов болгарская палочка, закваска «Наринэ», молочнокислый стрептококк не приводят к снижению числа колоний условно патогенных микроорганизмов. Лактобактерин в два раза снижает число колоний золотистого стрептококка. Между тем образцы лактобацилл из кумыса и шубата (10^6 бактерий) эффективно снижали концентрацию золотистого стафилококка и гемолитической кишечной палочки с 10^8 до единичных колоний или до 0, а концентрацию *B. subtilis* — с 10^8 до 10^2 .

Далее было проведено изучение антагонизма отобранных штаммов бактерий по отношению к условно патогенным микроорганизмам *in vitro* (табл. 1). Штамм *L. fermentum* проявил более сильную антагонистическую активность, чем штамм *L. acidophilus*. Причем, наиболее стабильные результаты показал штамм, выделенный из шубата с более выраженной активностью кислотообразования.

Таблица 1

Антагонистическая активность лактобактерий в отношении некоторых микроорганизмов

Штамм	Радиус зон задержки роста микроорганизмов-индикаторов (мм)			
	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	13,4±1,7	25,8±2,6	18,5±1,6	11,2±0,9
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10,9±0,8	5,6±0,4	0	4,1±0,3

Штамм бифидобактерий *B. bifidum* по результатам совместного культивирования снижал концентрацию *C. albicans*, *S. aureus* и *B. subtilis* с 10^6 до 10^2 , а *E. coli* — до единичных колоний.

Антагонизм микроорганизмов обусловлен активностью кислотообразования, скоростью размножения микробной популяции, конкуренцией за источник питания и выработкой биоцинов, подавляющих условно патогенные бактерии. В отличие от чистых штаммов, продукты питания на их основе часто утрачивают или снижают антагонистическую активность.

Для получения йогуртоподобных образцов на соевом молоке использовали *B. bifidum* и *L. fermentum*. Подбор технологического процесса позволил получить йогуртоподобный продукт с хорошими вкусовыми качествами — соевый йогурт.

По результатам культивирования условно патогенных микроорганизмов после воздействия на них соевого йогурта (табл. 2) можно сделать вывод, что бифидобактерии и лактобактерии сохранили свою высокую антагонистическую активность.

Таким образом, на основании полученных результатов можно предположить, что полученный образец соевого йогурта может представить собой перспективный отечественный пробиотик.

Таблица 2

**Результат культивирования условно патогенных и патогенных микроорганизмов
в соевом йогурте (содержание бифидобактерий в 1 мл йогурта – 10^8 КОЕ, лактобацилл – 10^7 КОЕ)**

Наименование микроорганизма	КОЕ/мл, внесенное в йогурт	КОЕ/мл после инкубации	Количество бифидобактерий после инкубации	Количество лактобацилл после инкубации
<i>Pseudomonas aeruginosae</i>	10^6 10^4 10^2	10^5 10^3 abs	10^7 10^7 10^7	10^6 10^6 10^7
<i>Shigella sonnei</i>	10^6 10^4 10^2	10 10 abs	10^8 10^8 10^8	10^7 10^7 10^7
<i>Shigella flexneri</i>	10^6 10^4 10^2	10^2 10^2 abs	10^8 10^8 10^8	10^7 10^7 10^7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10^6 10^4 10^2	abs abs abs	10^8 10^8 10^8	10^7 10^7 10^7

Примечание: abs — отсутствие микроорганизма

Литература

1. Бабин В.Н., Домарадский И.В., Дубинин В.Н. // Рос. хим. журн. — 1994. — Т. 39. — № 6. — С. 66–78.
2. Барановский А.Ю., Кондрашина Э.А. Дисбактериоз и дисбиоз кишечника. — СПб., 2002.
3. Блинкова Л.П. Бактериоцины: критерии, классификация, свойства, методы выявления // Журн. микробиол. — 2003. — № 3. — С. 109–113.
4. Блинкова Л.П. Перспективы использования бактериоцинов для профилактики и терапии инфекций // Журн. микробиол. — 1984. — № 5. — С. 10–14.
5. Ленцнер А.А. Лактобациллы микрофлоры человека: Автореф. дисс. д-ра мед. наук. — Тарту, 1972.
6. Микельсаар М.Э. Лактобациллы в микрофлоре кала человека при некоторых неинфекционных заболеваниях желудочно-кишечного тракта: Автореф. дисс. канд. мед. наук. — Тарту, 1969.
7. Микельсаар М.Э., Ленцнер А.А. Microbielle Umwelt und Antimicrobielle Massnahmen. — Leipzig, 1982. — S. 89–96.
8. Мухина Ю.Г. Диагностика и коррекция дисбактериоза у детей // Рус. мед. журн. — 1999. — Т. 7(11). — С. 487–494.
9. Парфенов А.И. Микробная флора кишечника и дисбактериоз // Рус. мед. журн. — 1998. — Т. 6(18). — С. 1170–1173.
10. Пилат Т.Л., Иванов А.А. Биологические добавки к пище (теория, производство, применение). — М.: Аввалон, 2002. — 710 с.
11. Пищевая химия / Под ред. Нечаева А.П. — СПб.: ГИОРД, 2003.
12. Шендеров Б.А., Манвелова М.А. Функциональное питание и пробиотики: микробиологические аспекты. — М., 1997.
13. Muriana P.M., Klaenhammer T.R. Conjugal transfer of plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity of *Lactobacillus acidophilus* 88 // Applied and Environmental Microbiology. — 1987. — Vol. 53. — P. 553–560.

DEVELOPMENT A NEW TYPE OF FUNCTIONAL DIETARY FOOD AND THE STUDY OF ITS EXHIBITED ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Yu.S. DUNAEVSKAYA¹, O.V. LUKIN¹, N.M. SHUSTROVA², S.O. LUKIN¹

¹ *D.I. Mendeleev Russian Chemical-Technological University,*

² *N.F. Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology RAMS, Moscow*

The article presents information on obtaining samples of the new yoghurt like probiotic product prepared with soy extract (milk). Provides information about used for this purpose, strains of lacto- and bifidobacteria. It presents data on the bactericidal activity of the product.

Keywords: dysbacteriosis, probiotics, soy products, dietary food.

ЭКДИСТЕРОИДСОДЕРЖАЩИЕ РАСТЕНИЯ – ИСТОЧНИКИ НОВЫХ АДАПТОГЕНОВ

В.В. ВОЛОДИН^{1*}, С.И. МАТАЕВ²

¹ Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар,

² Центр профилактического и лечебного питания Тюменского НЦ СО РАМН, Тюмень

В обзоре даны современные представления о растительных адаптогенах как медиаторах реакции стрессового ответа. Показано, что фитоэкдистероиды — структурные аналоги гормонов линьки беспозвоночных — отвечают критериям адаптогенов, повышающих неспецифическое сопротивление организма к неблагоприятным факторам среды, физической и психической нагрузке и стрессу. Представлены результаты фармакологических исследований новой экдистероидсодержащей субстанции Серпистен, свидетельствующие о выраженном актопротекторном, стресс-протекторном, противоишемическом, противодиабетическом, противолучевом, нейротропном и иммуномодулирующем действии. Высказаны гипотезы о системном и клеточном механизме действия фитоэкдистероидов на млекопитающих. Показана перспектива использования фитоэкдистероидов в составе биологически активных добавок к пище и продуктов функционального питания в восстановительной медицине, гериатрии и спорте.

Ключевые слова: фитоэкдистероиды, адаптогены, стресс-протекторы, медицина, гериатрия, спорт.

Современные представления об адаптогенах

В настоящее время важным направлением современной восстановительной медицины является разработка новых фармакологических средств и биологически активных добавок к пище из растительного сырья для коррекции адаптивных реакций организма при действии неблагоприятных факторов окружающей среды, высокой физической и эмоциональной нагрузки. Традиционная медицина многих народов мира также свидетельствует об использовании средств растительного происхождения для защиты человека от неблагоприятных природных факторов, что было важно для выживания этносов [13]. Термин «адаптоген» не слишком знаком ученым и медикам за пределами России и стран бывшего СССР. Этот термин был предложен советским ученым Н.В. Лазаревым и в дальнейшем развит И.И. Брехманом применительно к некоторым растениям Дальнего Востока и Сибири и содержащимся в них веществам, которые увеличивают физическую работоспособность и устойчивость организма по отношению к неблагоприятным

факторам среды. В научной медицине наиболее известны растения-адаптогены группы женьшеня (женьшень *Panax ginseng* C.A. Mey., аралия высокая — *Aralia elata* (Miq.) Seem., элеутерококк колючий — *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim., заманиха высокая — *Oplopanax letus* Nakai, лимонник китайский — *Shisandra chinensis* (Turcz.) Baill., а также родиола розовая — *Rhodiola rosea* L. и левзея сафлоровидная (=рапонтикум сафлоровидный) — *Leusea carthamoides* (Willd.) DC. (= *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Pjin).

Физиологическая активность адаптогенов отвечает трем критериям: 1) адаптогены должны быть совершенно безвредны для организма, обладать широким спектром терапевтического действия, но при этом вызывать минимальные сдвиги в организме в норме; 2) неспецифическое действие адаптогенов определяется увеличением устойчивости организма к вредному действию большого числа факторов физической, химической и биологической природы; 3) адаптогенам свойственно нормализующее действие, которое не зависит от направленности предшествующих сдвигов. Действие адаптогенов не специфично и универсально. Поэтому устойчивость организма по отношению к действию природных (гипоксия, неоптимальный температурный и световой режим) и техногенных (например, токсичные загрязнители) факторов, а также при физической и эмоциональной нагрузке должны возрастать при приеме адаптогенов. Благодаря современным исследованиям было установлено, что механизм

© 2011 г. Володин В.В., Матаев С.И.

* Автор для переписки:

Володин Владимир Витальевич,
д.б.н., профессор, зав. лабораторией биохимии и биотехнологии
Института биологии Коми НЦ УрО РАН
Адрес: 167982 Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28
E-mail: volodin@ib.komisc.ru

действия адаптогенов связан с их способностью регулировать реакцию стрессового ответа [25, 30]. Становится очевидным, что адаптогены нельзя строго отнести ни к фармакологическим средствам, ни к обычной пище. По своей природе и механизму действия они стали весьма многообещающими агентами не только для создания новых лекарственных препаратов адаптогенного действия, но и для получения биологически активных добавок к пище и функциональных продуктов питания для здоровых людей, работающих в различных экстремальных условиях, спортсменов, а также пожилых людей.

Вещества-адаптогены разделяют на три группы [30]: фенольные соединения, тетрациклические тритерпеноиды (тритерпеновые гликозиды) и оксипирины и отмечают, что первые две группы соединений структурно подобны эндогенным стрессовым медиаторам симпато-адреналовой и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой систем. Фенольные соединения, такие как фенилпропаноиды, фенилэтановые производные и лигнаны, структурно подобны катехоламинам, которые являются важными медиаторами симпато-адреналовой системы и активируют систему стресса на ранних стадиях стрессового ответа. Тритерпеновые гликозиды, например, кукурбитацин R (диглюкозид из корней переступня белого — *Bryonia alba*) и выделенный из корневищ женьшеня (*Panax ginseng*) гинзенозид Rb, структурно подобны кортизолу — гормону стресса, защищающему организм от перенапряжения в ответ на действие стрессовых факторов или агентов. Оксипирины, будучи окисленными жирными кислотами, проявляют действие, свойственное простагландинам. Например, таким действием обладают ненасыщенные полигидроксильированные высшие жирные кислоты переступня белого. Благодаря успехам в изучении химического состава растений-адаптогенов экстракты корневищ родиолы розовой, содержащей салидрозид и гликозиды коричневого спирта, корневищ элеутерококка колючего и плодов лимонника китайского, содержащих производные лигнанов (соответственно элеутерозиды и схизандрин), отнесены к первой группе адаптогенов. В то же время экстракты женьшеня и витания снотворной (*Withania somnifera*) являются представителями второй группы. Из сказанного становится понятной определенная специфика фармакологического действия препаратов на основе различных растений-адаптогенов, поскольку содержащиеся в них вещества из-за структурной близости к эндогенным медиаторам той или иной природы оказывают воздействие на различные звенья реакции стрессового ответа.

Способность адаптогенов регулировать уровень катехоламинов и кортизола и, что, пожалуй, еще более важно, оптимизировать соотношение инсулин/контринсулярные гормоны, позволяет использовать адаптогены для коррекции как углеводного, так и липидного обмена, а также в качестве неспецифических стресс- и геропротекторных средств. В основе этого направления лежит теория интегральной медицины В.М. Дильмана, связывающая гомеостатические нарушения при естественном старении с возрастным изменением функций адапционных систем (изменение порога чувствительности гипоталамуса, гиперкортицизм и т.д.) и метаболической иммунодепрессией [11]. В частности, в качестве средств для профилактики болезней старения В.М. Дильман предложил использовать противодиабетические препараты (фенформин). Поскольку основными показателями, характеризующими развитие болезней старения, а также стрессорные реакции, являются изменения углеводного и липидного обмена, при изучении антистрессовых свойств адаптогенов сразу же была обнаружена их противодиабетическая и гиполлипидемическая активность. Например, сахароснижающее действие женьшеня давно известно в народной медицине Востока, а затем оно было экспериментально доказано при гликемиях различной этиологии [6]. Было также показано на модели аллоксанового диабета, что использование экстракта элеутерококка приводит к значительному снижению уровня глюкозы в крови и моче и увеличению выживаемости животных. Особенно эффективным оказалось профилактическое введение данного экстракта [3, 4, 10, 18]. Положительные результаты были получены и при использовании экстрактов левзеи сафлоровидной и родиолы розовой при лечении больных сахарным диабетом в условиях клиники [14]. Нормализация уровня глюкозы и липидов в крови [24] была отмечена и при сравнительном изучении антистрессорного действия экстрактов растений-адаптогенов, в том числе элеутерококка, бадана тихоокеанского (*Bergenia pacifica*), родиолы розовой и шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis*), на модели иммобилизационного стресса, а также на беспородных белых мышках с опухолью Эрлиха.

Фитоэкидистероиды — новые растительные адаптогены

Ярко выраженным адаптогенным действием обладает растение левзея сафлоровидная. Ее химический состав долгое время оставался неизученным, однако этот факт не помешал разработке в 60-е годы XX века

в Советском Союзе жидкого экстракта тонизирующего действия из корневищ этого растения, стандартизованного по сумме экстрактивных веществ. Из наземной части этого вида растений были получены лечебно-профилактические препараты и добавки для использования в ветеринарии и животноводстве для откорма молодняка крупного рогатого скота, стресс-протекторные средства и средства, регулирующие репродуктивную функцию коров [19]. Позже было установлено, что левзея содержит вещества, отличающиеся по своей структуре от веществ-адаптогенов перечисленных выше групп. Ими оказались фитостероиды, являющиеся полигидроксированными стеринами, структурно идентичными или близкими истинным гормонам линьки насекомых [1]. Многими исследованиями было показано, что 20-гидроксиэкдизон (20E) — основной экдистероид растений — ответственен за основные фармакологические эффекты левзеи, а также некоторых других видов растений, в которых были обнаружены экдистероиды [2]. К сожалению, систематических исследований механизма действия фитостероидов как адаптогенов, то есть участников реакции стрессового ответа, до настоящего времени не проводилось.

Структурная идентичность фитостероидов истинным гормонам линьки насекомых, собственно, и предопределила принципиально иной исторический путь, по которому пошло изучение физиологической активности фитостероидов. Если изучение традиционных растений-адаптогенов (женьшень и элеутерококк) пошло по пути этнофармакологии, то изучение физиологической активности фитостероидов у млекопитающих началось с постановки теоретической проблемы, связанной с филогенезом живых организмов, — могут ли экдистероиды, будучи гормонами насекомых, оказывать какое-либо физиологическое действие на организмы, не способные к их эндогенному продуцированию и стоящие по сравнению с беспозвоночными на более высокой ступени эволюции. Когда был выявлен анаболический эффект и отсутствие гормонального действия экдистероидов на млекопитающих, открылась перспектива использования этих соединений в медицине, а затем были выявлены многочисленные фармакологические эффекты [27]. В Советском Союзе научной школой академика Н.К. Абубакирова (Институт химии растительных веществ АН УзССР, Ташкент) было проведено углубленное фармакологическое изучение 20E, выделенного из подземных органов рапонтикума сафлоровидного, которые привели к созданию первого экдистероидсодержащего препарата Экдистен тонизирующего действия [17].

Практически сразу после обнаружения экдистероидов в растениях японские, а затем советские исследователи показали, что фитостероиды благоприятно влияют на липидный и углеводный обмен у теплокровных животных. Например, было выявлено, что 20E, введенный пер ор крысам, снимает гипергликемию, вызванную либо глюкозой, либо аллоксаном [28, 32], а также стимулирует включение глюкозы в гликоген в печени мышей [33] и регулирует расход глюкозы в тканях [21]. По-видимому, механизмом противодиабетического действия препарата Экдистен является повышение чувствительности тканей к инсулину [15]. В те же годы было показано, что экдистероиды подавляют биосинтез холестерина *de novo* и увеличивают скорость его катаболизма. Эти данные открыли перспективу создания новых противодиабетических и гиполипидемических средств на основе фитостероидов.

Экдистероидсодержащая субстанция Серпистен

В лаборатории биохимии и биотехнологии Института биологии Коми НЦ УрО РАН было установлено, что в листьях растений серпухи венценосной (*Serratula coronata*, сем. *Asteraceae*) из флоры Западной Сибири, интродуцированной в условия Республики Коми [20], содержание экдистероидов на порядок выше, чем в корневищах рапонтикума сафлоровидного [23]. Другая особенность серпухи венценосной заключается в наличии в листьях растений дополнительного экдистероида — инокостерона (In), являющегося структурным изомером 20E [22]. Согласно данным литературы [29], экдистероиды обладают очень низкой токсичностью: при внутрибрюшинном и пероральном введении 20E в опытах на мышах LD₅₀ составляла 6,4 и 9,0 г/кг, соответственно, а при введении инокостерона — соответственно 7,8 и 9,0 г/кг. Оценка острой и хронической токсичности субстанции Серпистен была проведена в отделе радиоэкологии Института биологии Коми НЦ УрО РАН. Оценка мутагенного действия осуществлялась совместно с Институтом генетики и цитологии СО РАН (г. Новосибирск). Оценку генотоксического действия Серпистена проводили путем подсчета хромосомных аберраций в клетках костного мозга мышей, получивших внутрижелудочно однократную дозу, превышающую терапевтическую дозу в 100 раз (1000 мг/кг), в качестве препарата сравнения использовали цитостатик — циклофосфан в дозе 50 мг/кг. Установлено, что препарат в дозе 1000 мг/кг не вызывает увеличения частоты образования хромосомных аберраций в клетках

костного мозга линейных мышей, что свидетельствует об отсутствии генотоксических свойств Серпистена. Эти результаты хорошо согласуются с данными литературы о генопротекторном эффекте препаратов на основе фитоэкдистероидов при отравлении лабораторных животных тетрахлорметаном и хлорофосом. Таким образом, в изученном диапазоне доз, которые на порядок превышают рекомендуемые терапевтические дозы, Серпистен на основе суммы экдистероидов растений серпухи венценосной не обладает острой и хронической токсичностью и мутагенными свойствами [22].

Фармакологическое изучение Серпистена, представляющего собой смесь 20E и In в характерном для нативных растений соотношении 8 : 1, позволило сделать заключение о соответствии фитоэкдистероидов критериям адаптогенов. Совместно с кафедрой физиологии человека и животных Сыктывкарского государственного университета (Петрова Н.Б.) показано уменьшение вклада в общий адаптационный синдром катоксических механизмов, в частности, чрезмерной активации ведущей системы стресс-реакции — симпатoadrenalовой системы при действии Серпистена в тесте на адренореактивность эритроцитов крыс в стрессовых условиях (введение физиологического раствора) [9]. Одним из важных признаков формирования в организме состояния неспецифической повышенной сопротивляемости является повышение мышечной и психической работоспособности при использовании различных функциональных нагрузок. В работах лаборатории биохимии и биотехнологии, выполненных Л.Д. Пчеленко, адаптогенное действие субстанции Серпистен оценивали по трем критериям: актопротекторному, ЦНС-тонизирующему и анаболическому действию. Выносливость лабораторных мышей к динамической нагрузке у животных оценивали по времени плавания в стандартном тесте (плавание до отказа). Статическую нагрузку измеряли по величине максимального веса, которое животное может поднять, и по времени удерживания на шесте. Исследования показали высокий уровень актопротекторного действия изучаемой субстанции, причем эффект зависел от дозы и возраста животных. Продемонстрирована индивидуальная чувствительность животных к препарату. Так, под действием Серпистена индивидуальный индекс прироста при плавании у нелинейных мышей колебался от 14 до 290%, у линейных — в отдельных случаях до 400% к уровню контроля. Анаболический эффект наблюдали только в группе неполовозрелых животных. У взрослых животных при отсутствии вы-

раженного анаболического эффекта отмечали высокий и устойчивый актопротекторный эффект, причем развитие и сохранение этого эффекта не сопровождалось нарушением системы терморегуляции и не давало пиrogenного осложнения. Важно отметить минимизацию тепловыделения при выполнении тестовой стандартной нагрузки, что, по-видимому, отражает адаптивный результат. Анализ полученных результатов показывает, что при минимальной суммарной дозе 10 мг/г энергетика и выносливость к экстремальным нагрузкам достоверно усиливаются, а конечная доза 50 мг/г может расцениваться как уровень достижения устойчивого адаптогенного эффекта. При этом актопротекторное действие Серпистена сохраняется и спустя семь дней после прекращения приема препарата — эффект последствия. Эти данные очень показательны в плане сравнения адаптогенов и препаратов стимулирующего действия (например, фенамина, при приеме которого, напротив, наблюдается фаза истощения после периода повышенной работоспособности). Серпистен обладает ЦНС-тонизирующим действием. Обнаружены ускорение ориентировочно-исследовательской реакции и стимуляция памяти у животных, получавших Серпистен, что выражалось в активации поиска, запоминания маршрута и в ускорении нахождения выхода из двойного Т-образного лабиринта. Таким образом, повышение физической и психической работоспособности и минимизация тепловыделения свидетельствуют о системных эффектах Серпистена, которые реализуются через ЦНС и эндокринную систему [22].

Исследование противоишемического и противодиабетического действия Серпистена было проведено совместно с межрегиональным центром «Адаптоген» (Санкт-Петербург). Установлено, что по сравнению с известным гипополипидемическим препаратом Аторвастатин (Pfizer, Германия) Серпистен обладает более выраженным противоишемическим действием: на фоне экспериментальной дислипидотеидемии у крыс она улучшает коронарный кровоток в три раза, снижает частоту возникновения экспериментального инфаркта миокарда в пять раз, способствует уменьшению площади очага некроза миокарда в 2,6 раза, улучшает коронарный кровоток в 1,5 раза в постинфарктный период по сравнению с контролем. Серпистен способствует повышению сократительной активности миокарда в постинфарктный период и нормализации внутрижелудочковой проводимости, обладает выраженным гипополипидемическим действием, значительно снижая содержание общих липидов и холестерина, β -ЛП и триглицеридов, при

этом достоверно увеличивая содержание антиатерогенного α -холестерина (практически до уровня интактных животных) и фосфолипидов. Препарат уменьшал выраженность процессов перекисного окисления липидов в миокарде [8].

Серпистен проявлял противодиабетическую активность, увеличивая выживаемость лабораторных животных (крысы-самцы) с экспериментально вызванным аллоксановым диабетом и уменьшая полидипсию. При экспериментальном сахарном диабете данный препарат снижал уровень гипергликемии и концентрацию гликозилированного гемоглобина в крови экспериментальных животных, оказывая тем самым профилактическое действие в отношении развития основных осложнений сахарного диабета. На фоне лечения Серпистеном содержание общих липидов, холестерина и β -липопротеинов нормализовалось практически до уровня таких показателей у интактных животных, а триглицеридов — достоверно снижалось [7].

Заслуживают интереса данные об адаптогенном действии Серпистена при действии на организм повреждающих факторов физической и химической природы (гамма-излучение и фенилгидразин как гемолитик). Противолучевое действие Серпистена показано А.Г. Кудяшевой и сотрудниками отдела радиэкологии Института биологии Коми НЦ УрО РАН [16], гематопротекторное действие — сотрудниками кафедры физиологии человека и животных Сыктывкарского государственного университета под руководством Н.А. Мойсеенко [20]. Как отмечалось выше, экидистероиды являются гормонами линьки и метаморфоза насекомых. Экзогенные экидистероиды при введении в состав питательных сред личинкам насекомых или нанесении на наружные покровы насекомых вызывают различные патофизиологические эффекты или гибель личинок. Действительно, погружение личинок мельничной огневки на 5 с в водные растворы приводит к патологическим нарушениям их развития и гибели на седьмые сутки. Погружение личинок в чистый метанол, как и ожидалось, также привело к 100%-ной гибели личинок на седьмой день эксперимента. В то же время метанольные растворы экидистероидов в концентрации 0,05% оказали меньшее токсическое действие, при этом на 10-й день наблюдений осталось 60% живых гусениц, которые прошли стадию окукливания, хотя выхода имаго все же не наблюдалось. Полученные данные свидетельствуют об адаптогенном действии экидистероидов на фоне повреждающих химических агентов и на членистоногих, у которых эти соединения выполняют роль гормонов [22].

Совместно с Институтом физиологии Коми НЦ УрО РАН (Борисенков М.Ф.) проводится изучение влияния субстанции Серпистен на характеристики суточного ритма общей антиоксидантной активности (ОАА) слюны человека. Установлено, что в первые сутки приема препарата наблюдается снижение показателей суточного ритма ОАА слюны, которое сменяется значительным подъемом показателей, в первую очередь, амплитуды ритма на восьмой день. В отличие от мелатонина, Серпистен избирательно увеличивает амплитуду суточного ритма ОАА слюны — наиболее важного показателя хроноструктуры организма, отражающего степень синхронизации биоритмов организма с суточными колебаниями показателей окружающей среды, прежде всего, светового режима. Полученные данные свидетельствуют о перспективах дальнейшего изучения Серпистена в качестве онко- и геропротекторов, а также адаптогенного средства на Севере в условиях «полярного дня» [5].

Совместно с Санкт-Петербургским государственным медицинским университетом и Институтом физиологии Коми НЦ УрО РАН исследованы изменения трансмембранных калиевых, кальциевых и натриевых ионных токов изолированных нейронов моллюска *Lymnaea stagnalis* под влиянием субстанции Серпистен в широком интервале концентраций 0,01–1000 мкг/мл. Использован метод фиксации мембранного потенциала. Впервые установлено, что Серпистен неизбирательно активизирует все ионные токи, увеличивая их амплитуду на 2–15%, а также снижает неспецифические токи утечки мембраны. Натриевые токи при действии исследуемого препарата в концентрациях 100 и 1000 мкг/мл по сравнению с контролем снижались на 5–10%. Эффекты были обратимы. Кинетика развития ионных токов под влиянием субстанции Серпистен не изменялась. Данные подтверждают выраженное нейротропное действие изучаемой субстанции [12].

В развитие уже известных разнообразных иммуномоделирующих эффектов экидистероидов совместно с Центром лабораторной диагностики (г. Екатеринбург) было показано, что за счет увеличения внутриклеточного уровня цАМФ Серпистен активизирует презентацию рецепторов CD2 в Т-клетках *in vitro*, которые находятся в состоянии супрессии у лиц со вторичным или вызванным фармакологически иммунодефицитом. Было обнаружено, что Серпистен действует подобно синтетическому психоиммуномодулятору 1-окси-4-оксоадамтану и превосходит по своему эффекту тимомиметический препарат левомизол. Кроме того, оказалось, что Серпистен

модулирует фторид-индуцированный респираторный взрыв нейтрофилов человека подобно водорастворимым антиоксидантам [31].

Совместно с Военно-медицинской академией им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург) были показаны два чрезвычайно важных эффекта, проливающих свет на системный и клеточный механизм действия экидистероидов у теплокровных животных:

1. У крыс в дексаметазоновом тесте на фоне Серпистена происходит более выраженное снижение кортикостерона по сравнению с контрольной группой животных. В плане понимания центрального действия Серпистена можно предположить, что Серпистен понижает порог чувствительности гипоталамуса к действию тестовой дозы дексаметазона, способствуя реализации механизма отрицательной обратной связи. Повышение чувствительности гипоталамуса к гормональному вызову и последующее снижение содержания кортикостерона в крови характеризует позитивное геропротекторное («противовозрастное») действие Серпистена, что находится в соответствии с теоретическими установками В.М. Дильмана [11].

2. Адаптогенное действие экидистероидов реализуется путем индукции биосинтеза белков теплового шока в различных тканях крыс таким образом, что курсовое введение Серпистена запускает механизмы срочной адаптации, наилучшим образом проявляющиеся в печени и сердце крыс, что свидетельствует об активации защитных механизмов клетки [26].

Заключение

Таким образом, получение экспериментальных доказательств соответствия фитоэкидистероидов критериям адаптогенов, участвующих в реакции стрессового ответа как на организменном, так и на клеточном и молекулярном уровнях, открывает перспективу использования фитоэкидистероидов в гериатрии, восстановительной и спортивной медицине. Особенно остро проблема улучшения качества жизни пожилых людей обозначена в северных регионах, где их проживание отягощено целым рядом экологически неблагоприятных факторов среды (особенно неоптимальный световой режим) и где, по данным статистики, имеется предрасположенность к заболеваниям, связанным с нарушением гормонального, липидного и углеводного обмена, как раз вызванные факторами Севера. Применение экидистероидсодержащих препаратов может быть эффективным для пожилых пациентов, страдающих возрастными нейродегенеративными заболеваниями, ги-

потонией и вегето-сосудистой дистонией, подверженных возрастной депрессии и при старческих расстройствах мозговой деятельности. Экидистероидсодержащие препараты могут оказаться перспективными для снятия синдрома хронической усталости, повышения общего жизненного тонуса, снижения нервной и мышечной утомляемости, улучшения процессов памяти и внимания, снижения уровня сахара, в реабилитации постинсультных и постинфарктных состояний. Препараты, содержащие фитоэкидистероиды, могут оказаться весьма эффективными и для профилактики и поддерживающей терапии репарационных процессов, в том числе при лечении воспаления, сосудистых и иммунологических заболеваний, для ускорения заживления ран, ожогов и травм, чему особенно подвержены пожилые люди с ослабленным физическим и жизненным тонусом. Подытоживая, можно сказать, что поддерживающая фитотерапия с использованием растительных экидистероидов видится весьма перспективным направлением современной гериатрии, о чем свидетельствуют результаты наших многолетних исследований, а также анализ тенденций исследований фармакологической активности фитоэкидистероидов и создания экидистероидсодержащих препаратов в мире.

По результатам проведенных исследований Федеральная служба Роспотребнадзора (Москва) зарегистрировала сырье «Серпухи венценосной листья» (№ 77.99.23.3.У.1922.3.08 от 11.03.2008, ТУ 9371-001-15092611-2008) и субстанцию Серпистен (№ 77.99.23.3.У.1923.3.08), а также капсулированные формы биологически активных добавок на ее основе: Кардистен, Диастен и Адастен соответственно противоишемического, противодиабетического и иммуностимулирующего действия.

Исследования выполнены при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (проект № 09-П-4-1013: «Молекулярно-клеточные механизмы стресс-устойчивости и оценка возможности фитофармакологической коррекции адаптивных реакций организма в неблагоприятных условиях окружающей среды, высоких физических и психоэмоциональных нагрузок») и программы Отделения биологических наук РАН «Биологические ресурсы России, оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга» (проект № 09-Т-4-1002: «Состояние ресурсов полезных растений Европейского Северо-Востока России: мониторинг и разработка биотехнологических подходов по рациональному использованию и воспроизводству»).

Литература

1. Абубакиров Н.К. Экдистероиды цветковых растений (Angiospermae) // Химия природных соединений. — 1981. — № 6. — С. 685–701.
2. Ахрем А.А., Ковганко Н.В. Экдистероиды: химия и биологическая активность. — Минск, 1989. — 327 с.
3. Бездетко Г.Н. Влияние профилактического и лечебного действия элеутерококка на течение аллоксанового диабета / Сб.: Материалы к изучению женьшеня и других лекарственных средств Дальнего Востока. Вып. 7. Элеутерококк и другие адаптогены из дальневосточных растений. — Владивосток, 1966. — С. 81–84.
4. Бездетко Г.Н. и др. Влияние гликозидов элеутерококка на ядерную активность РНК-полимеразы скелетных мышц и печени после физической работы // Вопр. мед. химии. — 1973. — Т. 19. — Вып. 3. — С. 245–248.
5. Борисенков М.Ф., Перминов Е.В., Косова А.А. Влияние светового и электромагнитного излучений Солнца на суточный ритм общей антиоксидантной активности слюны человека на Севера // Усп. геронтол. — 2008. — Т. 21. — № 3. — С. 474–476.
6. Брехман И.И. Женьшень. — Л., 1957. — 180 с.
7. Володин В.В., Володина С.О. Патент № 2337698, Россия, МПК А61К 36/28. Противодиабетическое средство для лечения сахарного диабета II типа; ООО «Комибиофарм»; № 2007104249/15; заявл. 06.02.2007; опубл. 10.11.2008. Бюл. № 31.
8. Володин В.В., Володина С.О. Патент № 2337701, Россия, МПК А61К 36/28 «Гиполипидемическое и противоишемическое средство»; ООО «Комибиофарм»; № 2007104250/15; заявл. 06.02.2007; опубл. 10.11.2008. Бюл. № 31.
9. Володин В.В., Петрова Н.Б., Мойсеенко Н.А., Володина С.О. Патент № 2375071, Россия, МПК А61К 36/28. Антиагрегационное и стресс-лимитирующее средство; Институт биологии Коми НЦ УрО РАН; № 2008144160/15; заявл. 6.11.2008; опубл. 10.12.2009. Бюл. № 34.
10. Дардымов И.В. Женьшень, элеутерококк (к механизму биологического действия). — М., 1976. — 184 с.
11. Дильман В.М. Большие биологические часы (введение в интегральную медицину). — М.: Знание, 1981. — 208 с.
12. Игнатов Ю.Д. и др. Влияние экдистероидсодержащей субстанции из серпухи венценосной *Serratula coronata* L. на трансмембранные токи нейронов моллюска // Эксперим. клинич. фармакол. — 2006. — № 6. — С. 9–12.
13. Ильина И.В. Народная медицина Коми. — Сыктывкар, 1997. — 118 с.
14. Колмакова Л.Ф., Кутolina Н.И. Клинические наблюдения над действием экстрактов левзеи, элеутерококка и золотого корня у больных сахарным диабетом и другими заболеваниями / Стимуляторы центральной нервной системы. — Томск, 1966. — С. 130–132.
15. Косовский М.И. и др. Влияние неробола и экдистерона на некоторые связанные инсулинзависимые процессы в норме и при инсулинрезистентности // Проблемы эндокринологии. — 1989. — Т. 35. — № 5. — С. 77–81.
16. Кудяшева А.Г., Володин В.В., Шевченко О.Г., Загорская Н.Г., Володина С.О., Башлыкова Л.А., Ермакова О.В. Патент № 2326672, Россия МПК С2, А61К 31/565 А61Р 39/00. Противолучевое средство; Институт биологии Коми НЦ УрО РАН; № 2006108965/15; заявл. 21.03.06; опубл. 20.06.08. Бюл. № 17.
17. Куракина И.О., Булаев В.М. Экдистен — тонизирующее средство в таблетках по 0,005 г / Новые лекарственные препараты. Вып. 6. — М., 1990. — С. 16–18.
18. Мещерская К.А. Влияние препаратов корня элеутерококка на аппетит и углеводный обмен у нормальных животных и у крыс с аллоксановым диабетом / Симпозиумы по элеутерококку и женьшеню: XX сессия Комитета по изучению женьшеня и других лекарственных растений Дальнего Востока. — Владивосток, 1962. — С. 54.
19. Постников Б.А. Маралий корень и основы введения его в культуру. — Новосибирск, 1995. — 276 с.
20. Репина Е.Н., Мойсеенко Н.А., Иванкова Ж.Е. Влияние 20-гидроксиэкдизона из растений *Serratula coronata* L. на свойства белой и красной крови кроликов породы шиншилла // Фундаментальные исследования. — 2004. — № 2. — С. 151–153.
21. Сыров В.Н., Насыров С.С., Хушьяктова Э.А. Результаты экспериментального изучения фитоэкдистероидов в качестве стимуляторов эритропоэза у лабораторных животных // Эксперим. клинич. фармакол. — 1997. — № 3. — С. 41–44.
22. Фитоэкдистероиды / Под ред. В.В. Володина. — СПб.: Наука, 2003. — 293 с.
23. Чадин И.Ф., Колегова Н.А., Володин В.В. Распределение 20-гидроксиэкдизона в генеративных растениях *Serratula coronata* L. // Сиб. экол. журн. — 2003. — № 1. — С. 49–53.
24. Янькова В.И., Гвозденко Т.А. Возрастные аспекты состояния пероксидации липидов и антиоксидантной защиты при действии аллоксана // Бюлл. эксперим. биол. мед. — 2005. — Т. 139. — № 3. — С. 283.
25. Яременко К.В. Оптимальное состояние организма и адаптогены. — СПб., 2007. — 129 с.
26. Andreeva L.I., Boykova A.A., Bykova A.A., Volodin V.V. Physiological and cellular effects of phytoecdysteroid preparation *Serpisten* under heat stress in rats / Proceedings of the 14th International Congress «Phytopharm 2010». — St.-Petersburg (Russia), 2010. — P. 13.
27. Lafont R., Dinan L. Practical uses for ecdysteroids in mammals and human: an update // Insect. Sci. — 2003. — Vol. 3. — № 7. — P. 30.

28. *Matsuda H. et al.* Effect of ecdysterone on experimental atherosclerosis in rabbit // *Folia Pharmacol. Jap.* – 1974. – Vol. 70. – P. 325–339.
29. *Ogawa S., Nishimoto N., Matsuda H.* Pharmacology of ecdysones in vertebrates / *Invertebrate endocrinology and hormonal heterophylly* / Ed. W.J. Burdette. – Berlin: Springer, 1974. – P. 341–344.
30. *Panosian A., Wikman G., Wagner H.* Plant adaptogens III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action // *Phytomed.* – 1999. – Vol. 6(4). – P. 287–300.
31. *Trenin D., Volodin V.* 20-Hydroxyecdysone as a human lymphocyte and neutrophil modulator: in vitro evaluation // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* – 1999. – Vol. 41. – N 3. – P. 156–161.
32. *Uchiyama M., Yoshida T.* Effect of ecdysterone on carbohydrate and lipid metabolism / *Invertebrate endocrinology and hormonal heterophylly*. Ed. W.J. Burdette. – Berlin: Springer, 1974. – P. 401–416.
33. *Yoshida T. et al.* Effect of ecdysterone on hyperglycemia in experimental animals // *Biochem. Pharmacol.* – 1971. – Vol. 20. – P. 3263–3268.

ECDYSTEROID CONTAINING PLANTS – SOURCES OF NEW ADAPTOGENS

V.V. VOLODIN¹, S.I. MATAEV²

¹ *Institute of Biology Komi SC UrD RAS, Syktyvkar,*

² *Preventive and Clinical Nutrition Center of the Tyumen SC SD RAMS, Tyumen*

Modern concept of plant adaptogens, as mediators of stress response reaction is revealed. It is shown that phytoecdysteroids, structural analogs of molting hormone of invertebrates, correspond to the criteria of adaptogens that increase non-specific resistance of the organism towards unfavorable factors of environment, high physical and mental loads and stress. The results of pharmacological studies of new ecdysteroid containing substance Serpisten showing pronounced actoprotective, stress-protective, antiischemic, antidiabetic, radioprotective, neurotrophic and immunomodulatory effects. A hypothesis about the system and the cellular mechanism of action of phytoecdysteroids in mammals are suggested. The prospects of using phytoecdysteroids as biologically active nutritional supplements and functional food in the rehabilitation medicine, geriatrics and sports are shown.

Keywords: phytoecdysteroids, adaptogens, stress protectors, medicine, geriatrics, sport.

КРАСНЫЕ ВОДОРОСЛИ – ПЕРСПЕКТИВНОЕ СЫРЬЕ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ И МОРСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

И.А. КАДНИКОВА*

Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (ТИНРО-Центр), Владивосток

В обзоре рассматриваются перспективы развития морской и пищевой биотехнологии на Дальнем Востоке на базе использования красных водорослей. Анализируется биологическая и пищевая ценность продуктов, полученных из различных видов этих ценных растений.

Ключевые слова: пищевая биотехнология, морская биотехнология, красные водоросли.

В настоящее время во всех дальневосточных морях насчитывается 318 видов красных водорослей, однако хозяйственное значение имеют 15 видов. По данным ФАО, мировая добыча красных водорослей составляет 2,6 млн. т красных водорослей: для производства агара и каррагинана их добывается 1,5 млн. т, для производства пищевой продукции – 1,1 млн. т. Морские водоросли – важный компонент макробиотического питания. Они занимают одно из первых мест по насыщению продуктов минеральными веществами.

В настоящее время ученые ТИНРО-Центра (Владивосток) изучают возможности использования красных водорослей в пищевом рационе человека. Установлено, что красные водоросли содержат в 30 раз больше калия, чем бананы, а также в 200 раз превосходят свеклу по количеству железа. Содержание белка в 2 раза больше, чем в некоторых сортах мяса. Из 160 видов используемых в пищу макрофитов более 80 приходится на красные водоросли. В качестве пищевого сырья наибольшее значение имеют представители родов Порфира и Пальмария, которые ценятся за нежность талломов и вкус, напоминающий креветку, а также питательную ценность и лечебные свойства. Одним из перспективных направлений в пищевой биотехнологии является разработка технологий пищевых продуктов из видов родов Порфира и Пальмария, обладающих высокой пищевой ценностью и перспективных по запасам. Результатом проводимых исследований будет ассортимент водорос-

левых продуктов: приправы, гарниры, сэнки; консервы, салаты; маринованные и мороженые водоросли и салаты, гарниры.

В морях Дальнего Востока имеются запасы других красных водорослей родов Хондрус, Тихокарпус, Одонталия, Неородомела, которые в странах Востока широко используются в пищевых целях (в этом случае уделяется больше внимания их биологической ценности). Вторым перспективным направлением в морской биотехнологии является разработка биотехнологических способов обработки красных водорослей, имеющих невысокую питательную ценность, для получения пищевых и функциональных продуктов. Биотехнологический способ обработки водорослевого сырья позволяет воздействовать на белок-полисахаридные связи, изменять структуру тканей водорослей и получать пищевые и функциональные продукты (пасты, паштеты, джемы) с высоким содержанием питательных веществ, регулирующих обмен веществ.

Установлено, что водоросль пальмария по пищевой ценности не уступает порфире. Она обладает пикантным вяжущим вкусом. По данным ряда исследователей, входящие в ее состав углеводы перевариваются практически полностью на 100%. Обычно их высушивают и продают нарезанными на узкие полоски, которые перед употреблением замачивают на 10 минут в холодной воде, а затем добавляют в супы или рагу, а иногда просто отваривают или жарят в масле и подают как овощи. Эти водоросли употребляют в сыром виде (в качестве салата), в вареном виде (в качестве гарниров, к мясным и рыбным блюдам) и в сушеном виде (в качестве закусочного продукта).

Порфира особенно ценится в Японии и Южной Корее, где она выращивается в больших количествах искусственно (400 тыс. т). Запах порфиры немного на-

© 2011 г. Кадникова И.А.

* Автор для переписки:

Кадникова И.А.

Тихоокеанский научно-исследовательский
рыбохозяйственный центр (ТИНРО-Центр),
690091 Владивосток, пер. Шевченко, 4.

поминает капусту, а вкусом — шпинат. У нас она известна под названием красного салата. Эту водоросль едят в сыром виде, в виде салатов или варят с мясом, рисом и другими продуктами. Основной способ переработки порфиры сырья заключается в промывке водой, измельчении, суспендировании в пресной воде, разливу суспензии в прямоугольные формы-рамки и высушивании ее на солнце или в сушильных камерах. Получаемые пластинки сухого нори используют как полуфабрикат при изготовлении вторых обеденных блюд, добавок к супам, соусам, гарнирам, салатам. Нори имеет легкий дымный привкус и тонкий океанический аромат. Этот продукт чаще всего используется при приготовлении ролетных суши-роллов, получивших известность во многих странах. Благодаря росту популярности японской кухни, основной составляющей которой являются водоросли, популярность их будет расти среди населения нашей страны.

Перспективно использование красных водорослей в пищевой биотехнологии для производства пищевых и функциональных продуктов.

В связи с вышесказанным следует сделать упор на развитие переработки этих водорослей на салаты и закуски по низким ценам, тем самым прививая культуру потребления водорослей в пищу в нашей стране.

Вторым перспективным направлением является создание биотехнологических способов обработки красных водорослей, имеющих невысокую питательную ценность, для получения пищевых и функциональных продуктов. Из других видов красных водорослей в пищевых целях широко используют хондрус, гигартину, иридею, грацилярию, но в этом случае уделяется больше внимания биологической ценности, а не питательной.

Биотехнологический способ обработки водорослевого сырья позволяет воздействовать на белок-полисахаридные связи, изменять структуру тканей водорослей, а в результате разрабатывать биотехнологии получения пищевых и функциональных продуктов с высоким содержанием питательных веществ (незаменимые аминокислоты, биологически значимые элементы, олигосахариды и пищевые волокна — полисахариды), регулирующих обменные процессы в организме.

Основные типы полисахаридов красных водорослей относятся к пищевым волокнам и не усваиваются организмом человека в результате отсутствия специфических ферментов. Ферментативная обработка сырья позволяет повысить пищевую ценность водорослей. Пищевые волокна выполняют важную физиологическую роль в организме человека, но не могут участвовать в биосинтетических реакциях. В результате исследования

избирательного действия на субстраты углеводсодержащего сырья могут быть подобраны условия получения олигосахаридов, имеющих высокую пищевую и биологическую ценность.

Свойства главной составляющей красных водорослей — сульфатированных галактанов — являются наиболее изученными, поэтому на них подробно останавливаться не следует.

Красные водоросли продуцируют разнообразные вторичные метаболиты, такие как терпеноиды, ацетогенины, производные аминокислот, полифенолы, многие из которых одновременно выполняют множество функций для водорослей, но при этом могут действовать как антимикробные вещества, УФ-защитающие агенты, как хорошие травяные детергенты и др. Из 1000 известных соединений 560 приходится только на одно семейство красных водорослей — Родомеловые. Это направление исследований быстро развивается в настоящее время.

Многие авторы отмечают способность морских организмов утилизировать некоторые растворенные компоненты вещества в воде и включать в состав своих метаболитов. К таким компонентам относятся галогены, прежде всего, бром, а также ионы сульфата. Содержание галогенированных соединений в водорослях может достигать 5% сухого веса. Бромфенолы обнаружены в одонталии, полисифонии, родомеле.

Во многих видах красных водорослей обнаружены гемагглютинины. В экстрактах тихокарпуса продемонстрирован высокий титр гемагглютинирующей способности, связанной с присутствием углеводсвязывающих белков-лектинов и ингибиторной активности по отношению к ацетилхолинэстеразе. Каиновая кислота, обладающая нервно-возбуждающим действием, найдена в пальмарии. Отмечается, что пальмария может служить естественным источником десмостерола.

Нами также было установлено, что красные водоросли обладают высокой способностью ингибировать рост бактерий. Наиболее перспективной в качестве антибактериального препарата по отношению к стафилококку является красная водоросль *Neorhodomella*. Высокую антигипертензивную активность показали красные водоросли *Chondrus armatus* и *Ahnfeltia tobuchiensis*.

Оценивая проблему в целом, можно заключить, что полный анализ биологически активных соединений, содержащихся в красных водорослях, позволит комплексно использовать возможности уникальной сырьевой базы Дальнего Востока. Перспективным направлением исследований представляется монито-

ринг биологически активных соединений водорослей с переходом от изучения химических компонентов, преобладающих в экстрактах, к минорным, но высокоактивным соединениям. Наиболее важными с этой точки зрения являются такие соединения, как полифенолы, флавоноиды, терпены, стеролы, лектины, ингибиторы протеиназ. Для проведения исследований будут освоены новые методы анализа. Анализ этих соединений даст возможность создать базу данных по их содержанию в промысловых и перспективных для промысла видах красных водорослей.

Таким образом, с одной стороны, неразвитость промысла, отсутствие промысловых и перерабатывающих организаций формально делают бесперспективными исследования красных водорослей в плане дальнейшего их использования. Однако, с другой стороны, именно исследованиями этих важных ресурсов можно привлечь к ним внимание профильных организаций.

Исходя из вышесказанного, выделены следующие направления исследований в области переработки красных водорослей для повышения эффективности рыбной отрасли Дальнего Востока, которая недоиспользует свою сырьевую базу:

- химико-гигиеническая оценка перспективных по запасам, но малоизученных красных водорослей и их компонентов как пищевого сырья;
- исследование биотехнологических методов обработки анфельции на основе использования ферментных препаратов для повышения эффективности извлечения агара и расширения ее комплексной переработки;
- разработка технологий пищевых продуктов — маринованных и мороженых салатов, приправ, консервированных жидких и сухих супов, консервов из водорослей родов Пальмария и Порфира;
- разработка биотехнологических способов обработки красных водорослей для получения пищевых и функциональных продуктов (паст, джемов, паштетов) с высоким содержанием питательных веществ — биологически значимых элементов, незаменимых аминокислот, олигосахаридов и полисахаридов;
- мониторинг БАВ промышленной анфельции и перспективных для промысла водорослей — полисифонии, неородомелы, птилоты, тихокарпуса — для использования в медицине, косметологии, сельском хозяйстве.

RED ALGAE – A PROMISING RAW MATERIAL FOR FOOD AND MARINE BIOTECHNOLOGY

I.A. KADNIKOVA

Pacific Scientific Research Fisheries Center (TINRO Center), Vladivostok

This review discusses the prospects for marine biotechnology and food in the Far East on the basis of red algae. Examines the biological and nutritional value of products derived from these different kinds of valuable plants.

Keywords: food biotechnology, marine biotechnology, red algae.

К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ВЫДАЮЩЕГОСЯ ИММУНОЛОГА НИЛЬСА ЙЕРНЕ

О.В. ВОРОБЬЕВА*

ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России,
Общество биотехнологии России им. Ю.А. Овчинникова, Москва



В 2011 году исполняется 100 лет со дня рождения лауреата Нобелевской премии Нильса Кая Йерне (в русскоязычных работах используется и транскрипция «Ерне»), который является одной из заметных фигур в иммунологии XX века. Этой памятной дате посвящается настоящая статья.

Curriculum vitae. Вначале надо дать небольшое пояснение. Ученый умер в 1994 году, и уже через 4 года появилась его подробная биография на датском языке [43], написанная Т. Содерквистом на основе личных архивов Йерне, которые он сам предоставил автору. В 2003 году вышел в свет перевод этой книги на английский язык

[44]. Содерквист собрал огромный материал, общаясь с ученым 8 лет (1986–1994 гг.), взял 160-часовое интервью, имел контакты с более 90 его коллегами, друзьями и родственниками. Поэтому имеется возможность дать более развернутые биографические сведения по сравнению с традиционными краткими подборками из справочников и энциклопедий и таким образом восполнить недостаток информации и избежать некоторых неточностей.

Прежде всего, следует однозначно определить национальную принадлежность Йерне. В ряде источников указывается на то, что он является «англо-датским» или «английским» исследователем. Между тем известно, что он родился 23 декабря 1911 года в Лондоне в семье датчан Ханса Йенсена Йерне и Эльзы Марии Линдберг (он был четвертым ребенком из пяти), которые в 1910 году приехали из Дании в Великобританию и в начале I Мировой войны переехали в Нидерланды (их предки столетиями жили на маленьком датском острове Фанё из группы Северо-Фризских островов и прилегающих землях западной Ютландии). Нильс Йерне получил британское гражданство (позднее — датское), однако в Великобритании в дальнейшем не проживал и не трудился. В течение жизни учился и работал в Нидерландах, Дании, США, Швейцарии, Германии, умер и похоронен во Франции. Так что есть все основания считать его датским исследователем, что и делают историки науки последнего времени. Правда, Нильс Йерне любил называть себя «гражданином Северного моря», так как вобрал в себя скандинавскую и английскую культуру.

Очень показательна динамика формирования ученого. При этом важно не упустить все периоды обучения и деятельности, включая и детали личной жизни. Особенно это касается промежутка времени 1928–1940 гг., который сам Йерне называл «темным средневековьем» [41]. Характерно, что многие биографы практически обходят молчанием эти годы. Нет никаких сведений и в автобиографии Йерне, написанной лаконично, в виде анкеты [20].

© 2011 г. Воробьева О.В.

* **Автор для переписки:**

Воробьева Ольга Вадимовна,
Общество биотехнологов России
им. Ю.А. Овчинникова

119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

E-mail: ptashka095@rambler.ru, obr@biorosinfo.ru

После переезда в Нидерланды семья Йерне жила в небольшом городке Ассенс, а затем перебралась в Роттердам, где Нильс в 1928 году окончил среднюю школу, получив степень бакалавра. По окончании школы он начал работать младшим клерком в банановой компании Elders & Fyffes. После трехлетней «банановой» стажировки в 1931 г. отец послал его обучаться химии (некоторые биографы говорят о физике) в Лейденский университет, однако родительская программа не была реализована. Молодой человек попал в полосу болезней роста: вступил в Лейденский студенческий союз, посещал пивные, читал Ницше, Пруста и запрещенные эротические новеллы. В результате двухлетние занятия химией не дали плодов — экзамены не были сданы. В возрасте 22 лет в 1934 г. он получил одобрение отца на осуществление второй попытки приобрести высшее образование — на этот раз на медицинском факультете Копенгагенского университета. Однако тут его подстерегла любовь: он женился на чешской художнице Ильзе Валь (1910–1945) — близкие ее называли «Тжек». Вскоре он был вынужден покинуть университет и вновь вернуться на стезю практики. Теперь отец предложил ему участвовать в разработке новых методов приготовления бекона. Пришлось ему потрудиться и продавцом в издательстве.

Третий шанс завершить университетский курс предоставился Нильсу Йерне в 1939 году. Он продолжил занятия медициной и окончил Копенгагенский университет в 1947 г., то есть получив степень доктора медицины в 35 лет. Не следует забывать, что учеба проходила во время оккупации Дании немецкими войсками: день — учебники и клиники, ночь — артистическая среда жены.

Этот полный драматизма период был омрачен и личным потрясением, связанным с самоубийством в 1945 году первой жены, оставившей ему двух сыновей: старший Айвар (1936 года рождения), младший Дональд (1941 года рождения). По окончании университета в 1947 г. и интернатуры Йерне во второй раз женился на Адде Сундсиг-Хансен (1914–1993) — брак распался в 1950-е годы. Чтобы больше не возвращаться к семейной теме, надо сказать, что в 1964 г. он женился в третий раз на Урсуле (Александре) Коль (1936 года рождения), с которой прожил до конца своих дней.

В 1943 году в бытность свою студентом, испытывая материальные затруднения, Йерне начал работать по совместительству секретарем в отделе стандартизации в Датском государственном институте сывороток (Копенгаген). Отдел был организован в 1920-е годы Комитетом по здравоохранению Лиги наций. В отделе Йерне обнаружил у себя способности к математическому анализу и

статистическим исследованиям. В Институте сывороток он трудился до 1956 года. Это место послужило для него стартовой площадкой для будущей работы в ВОЗ, где он много занимался проблемой стандартизации, в том числе вакцин и сывороток. Кроме того, здесь он приобщился к ведению научных исследований, чему способствовал руководитель отдела стандартизации Оле Моле (Ole Maaloe), в будущем один из основателей молекулярной биологии в Дании. Йерне получил тему, связанную с изучением проблемы авидности, используя количественные методы измерения силы связывания антител. В 1951 году он защитил диссертацию «Исследование авидности, основанное на кожной реакции кролика на смесь дифтерийного токсина-антитоксина». В этом же году появилась и публикация начинающего ученого на эту тему [19]. В предыдущие годы (1949) у него вышли две статьи в соавторстве по вопросам стандартизации в микробиологии, а еще ранее в 1944 г. была опубликована студенческая работа, посвященная деталям методов научных исследований (в основном статистическим аспектам). Таким образом, он вышел на рубеж активной самостоятельной научной работы в 40 лет, с отсрочкой около 20 лет по сравнению с традиционным возрастом вхождения в науку.

Под влиянием визита в отдел стандартизации в 1951 г. Дж. Уотсона и Г. Стента Йерне перешел на фаговую тематику и стал изучать авидность в системе бактериофаг-антифаг. По-видимому, не случайно Йерне выбрал для стажировки лабораторию Макса Дельбрюка, одного из лидеров знаменитой «фаговой группы», успешно работавшей в 1940–1950-е гг. в США. В 1954–1955 гг. Йерне получил возможность поработать в лаборатории М. Дельбрюка в Калифорнийском технологическом институте — «Калтехе» (Пасадена, США). Общение с этим выдающимся молекулярным биологом имело важные последствия: в конце командировки датский ученый подготовил статью с изложением новой гипотезы образования антител (теории «естественного отбора»), которую М. Дельбрюк представил к опубликованию в ведущем научном журнале — Докладах Академии наук США [30]. В литературе об ученых экстраординарного уровня, к которым, несомненно, относится Йерне, редко когда обходится без мифов. Биографы любят отмечать, ссылаясь на воспоминания самого Йерне [29], что идея естественного отбора в иммунном ответе пришла к Йерне перед отправлением в США в марте 1954 г. в Копенгагене, когда он возвращался домой с работы (иногда сообщается, что он при этом ехал на велосипеде

по мосту Лангебро). Простота решений типа ньютоновского яблока или сна Кекуле нередко подкупает, в том числе и историков науки. Между тем известно, что Н. Йерне летом 1954 года, за год до публикации ключевой статьи о селекционной теории в собственных экспериментах убедился в возможности существования специфических антител без исходного присутствия соответствующего антигена. К тому же, надо полагать, что окончательное оформление новой концепции проходило под влиянием Дельбрюка, который, как известно, умел выращивать таланты и способствовать генерации новых идей (например, опекал молодого Дж. Уотсона). Кроме указанной теоретической работы, Йерне в Калтехе выполнил практическое исследование вместе с учеником Дельбрюка Гюнтером Стентом, посвященное бактериофагам (материалы напечатаны также в 1955 году в Докладах Академии наук США, только на один номер раньше — см. полный список работ [4]).

С 1956 года Нильс Йерне перешел на административную работу в ВОЗ (Женева), где занимал пост руководителя отделов биологических стандартов и иммунологии. Здесь он прослужил шесть лет до 1962 года. С 1960 по 1962 гг. он был профессором кафедры биофизики Женевского университета.

В 1962 году Йерне был приглашен на должность заведующего кафедрой микробиологии Питтсбургского университета (США). Он проработал в Америке четыре года, после чего вернулся в Европу. С 1962 года он также являлся членом Консультативной экспертной комиссии по иммунологии ВОЗ.

С 1966 по 1969 гг. Йерне был директором Института Пауля Эрлиха во Франкфурте. Одновременно он состоял профессором экспериментальной терапии в Университете Иоганна Вольфганга Гете в этом же городе.

В 1969 году произошло важное событие в его жизни: компания Хоффманн ла Рош пригласила его на должность директора Института иммунологии в Базеле, которую он занимал до выхода на пенсию в 1980 году. Тем не менее он с 1981 года был избран почетным председателем Консультативного совета этого института. Им была выпущена книга к 25-летию института, в которой собраны его предисловия к институтским ежегодникам [18].

В 1981–1982 гг. Нильс Йерне выполнял обязанности специального советника по иммунологии при директоре Пастеровского института в Париже. С этих пор он стал жить во Франции, в местечке Кастильон дю Гар, в Лангедоке, вместе со своей женой Александрой.

Ученый скончался 7 октября 1994 года.

Научные достижения. Нильс Йерне относится к числу ученых теоретического склада. Ему принадлежат три теоретические концепции в иммунологии, предложенные в течение 30 лет активной деятельности, а также один оригинальный метод практического плана, широко применявшийся во второй половине XX века.

Безусловно, главным делом жизни Н. Йерне является формулирование теории биологической селекции в иммунологии. Его статья с изложением новой концепции «The natural-selection theory of antibody formation» вышла в свет в 1955 году (рис. 1).

Это фактически был подлинный международный научный дебют 44-летнего датского исследователя, который был поддержан авторитетом Макса Дельбрюка, благодаря чему работа вышла в солидном американском журнале «Proceedings of the National Academy of Sciences USA» [30]. Дельбрюк это сделал несмотря на то, что был соавтором совместной с Л. Полингом статьи 1940 г. в «Science», в которой выдвигалась идея матричного копирования молекул, в том числе антител [39].

Примечательно, что развиваемая Йерне идея была альтернативной господствовавшему в 1940–1950-е годы взгляду о матричном синтезе антител на шаблоне антигенов — инструктивной теории [13, 38]. Особый смысл это приобретало в связи с тем, что острие критики автора было направлено на самого Лайнуса Полинга, только что в 1954 году удостоенного Нобелевской премии по химии. Указанные обстоятельства объясняют хотя бы отчасти то, что Йерне не вступил в прямую полемику со своими именитыми оппонентами.

Суть гипотезы Н.К. Йерне сводилась к следующему. Все виды антител преформированы, существуют в организме в исходном состоянии до поступления антигена, а роль антигена заключается в выборе соответствующего вида антител. Йерне назвал это «естественным отбором» по аналогии с дарвиновской терминологией с целью придать иммунному ответу более глубокий биологический смысл по сравнению с простым химическим копированием. Позднее он дал этому наименование «дарвиновские обертоны» [29].

Йерне писал в своей эпохальной статье 1955 года: «Роль антигена не сводится ни к матричному синтезу, ни к модификации фермента. Антиген является лишь избирательным переносчиком спонтанно циркулирующего антитела к системе клеток, которые продуцируют это антитело. Молекулы глобулина постоянно синтезируются с большим разнообразием форм. Среди популяции циркулирующих молекул глобулина спонтанно имеются отдельные элементы, обладающие сродством к любому

*THE NATURAL-SELECTION THEORY OF
ANTIBODY FORMATION*

BY NIELS K. JERNE*

DIVISION OF BIOLOGY, CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY, PASADENA, CALIFORNIA

Communicated by M. Delbrück, September 14, 1955

An immense amount of experimental data related to the problem of antibody formation has accumulated. Theories offering a basic interpretation of these observations have, in contrast, been few. The theory formulated in the present paper, though highly speculative, attempts to provide a framework for the interpretation of the main features of antibody appearance in response to the injection of antigen into an animal.

Two views concerning the mechanism of antibody formation are at present most widely favored. One is the "antigen-template" theory, developed by Breinl,¹ Haurowitz,^{1,2} Mudd,³ Alexander,⁴ and Pauling.⁵ This theory assumes that antibodies can be produced only by cells in which the antigen is present. The specific affinity of an antibody molecule toward the antigen is due to a complementarity in structure derived from the folding of part of the polypeptide chain of a globulin molecule in direct contact with a determinant or haptenic region of the antigen. The antigen thus serves as a template in the final stage of formation of a globulin molecule.

The other view tries to establish a similarity between antibody formation and adaptive enzyme formation and allows for the continued production of antibody after the antigen has disappeared from the body. This is the "modified-enzyme" theory, formulated by Burnet^{6,7} and Fenner.⁷ They propose that the introduction of an antigen into cells, containing enzymes directed toward the disposal of effete cells and cellular debris from the organism itself, induces the formation of "enzymic units" adapted toward the destruction of the antigen. A renewed contact with the antigen stimulates the replication of these enzymic units. Circulating antibody molecules are partial replicas of the modified enzymic units, carrying specificity but lacking enzymic action.

The "natural-selection" theory, proposed in the present paper, may be stated as follows: The role of the antigen is neither that of a template nor that of an enzyme modifier. The antigen is solely a selective carrier of spontaneously circulating antibody to a system of cells which can reproduce this antibody. Globulin molecules are continuously being synthesized in an enormous variety of different configurations. Among the population of circulating globulin molecules there will, spontaneously, be fractions possessing affinity toward any antigen to which the animal can respond. These are the so-called "natural" antibodies. The introduction of an antigen into the blood or into the lymph leads to the selective attachment to the antigen surface of those globulin molecules which happen to have a complementary configuration. The antigen carrying these molecules may then be engulfed by a phagocytic cell. When the globulin molecules thus brought into a cell have been dissociated from the surface of the antigen, the antigen has accomplished its role and can be eliminated.

The introduction of the selected globulin molecules into a cell or the transfer of these molecules into another cell is the signal for the synthesis or reproduction of

антигену, на который животное может реагировать. Это так называемые «естественные» антитела. Введение антигена в кровь или лимфу приводит к избирательному прикреплению к поверхности антигена тех молекул глобулина, которые обладают комплементарной структурой. Антиген, несущий эти молекулы, может затем захватываться фагоцитирующей клеткой. Когда глобулиновые молекулы, поступившие таким образом в клетку, диссоциируют с поверхности антигена, последний выполняет свою роль и может быть элиминирован» [30, с. 849].

Рассматриваемая статья Йерне представляет собой беспрецедентное явление в истории иммунологии. Сама гипотеза излагается на одной странице текста, а остальные шесть страниц посвящены обсуждению существа дела с критическим анализом работ, обосновывающих матричную теорию (Pauling L., 1940 [38], Haurowitz F., 1952 [14]) и теорию «модифицированного фермента», сформулированную Ф. Бернетом и Ф. Феннером [9, 10]. При этом Йерне делает существенное дополнение к своей гипотезе: «Ключевым пунктом теории естественного отбора является постулат о том, что введение молекулы антитела в соответствующую клетку может быть сигналом для продукции большого числа антител данного типа. Это мнение необычно. Однако, поскольку ничего не известно о механизме синтеза антител в клетке, кажется априорно более резонным допустить, что животное может транслировать стимул, произведенный выработанными ранее белковыми молекулами, в повышенный синтез этого же типа молекул, чем предполагать, что животное может утилизировать все виды чужеродных молекул и встраивать их функционально и почти неизменно в самые интимные части его глобулин-синтезирующих клеток» [30, с. 854].

Целесообразно отметить в этой связи, что Н.К. Йерне в проводимой им в этой статье 1955 г. дискуссии с оппонентами, развивавшими инструктивную теорию, не упоминает о своем стороннике, а точнее — предшественнике Пауле Эрлихе, который в своей теории боковых цепей как бы предугадал принцип селективности иммунной реакции [12].

С исторической точки зрения все-таки нельзя отнести выдающееся озарение Йерне к прямому созданию клонально-селекционной теории. Эта заслуга, бесспорно, принадлежит Ф. Бернету, который в серии последовательных публикаций всесторонне аргументировал данную теорию и отстаивал ее в выступлениях и дискуссиях [6–8]. Независимо от Бернета большой вклад в обоснование клонально-селекционной теории внесли сначала Д. Толмейдж [45–47], а затем Дж. Ледерберг (лауреат Нобелевской премии 1958 г.) [33, 35]. Правда, следует

заметить, что, как сообщает сам Дж. Ледерберг [34], он посещал лабораторию Бернета, много общался с ним, возражал против его неприятия молекулярной биологии и даже выполнил с его сотрудником Дж. Носсалом совместное исследование [37].

Непосредственной реакции на указанную публикацию Йерне 1955 года в целом практически не наблюдалось, исключая работы с позитивной оценкой Ф. Бернета [6], Д. Толмейджа [46] и критические замечания Ф. Haurowitz (цит. по: [34]), адепта инструктивной теории, который, в частности, упрекнул автора в неупоминании имени Эрлиха как предшественника создания селекционной концепции. Один из немногих, кто сразу же поддержал Йерне в его радикальной постановке вопроса, шедшей вразрез с преобладавшим тогда мнением, был Дж. Ледерберг [34], который написал ему одобряющее письмо. Правда, у известного молекулярного биолога возникал вопрос, как в организме могут быть преформированы антитела к искусственным гаптенам, подобным азофениларсонату К. Ландштейнера. Кроме того, Ледерберг скептически отнесся к мысли о самовоспроизведении циркулирующих отобранных антигеном глобулиновых молекул. Отдельно стоит упомянуть о реакции Дж. Уотсона еще на стадии подготовки статьи к печати. Во время командировки в США в 1950-е годы Йерне в ночной беседе в кафе поделился с ним мыслями о своей идущей наперекор распространенному мнению гипотезе образования антител. Тот не был восхищен таким подходом и со свойственной ему прямоотой сказал: «Это дурно пахнет» («It stinks») [15]. Хотя это скорее говорит о резкости суждений молодого исследователя (ему было тогда 26 лет), чем о его устоявшейся позиции.

Однако можно сказать, что молекулярные биологи в целом (в их числе Сальвадор Лурия) доброжелательно восприняли революционную идею Йерне, чего нельзя сказать о большинстве членов профессионального сообщества иммунологов, остававшихся равнодушными, а глава американских иммунологов Олвин Паппенгеймер даже отпускал нелестные эпитеты в адрес теории Йерне. Это вызвало чувство обескураженности и неуверенности у неопытного ученого, сделавшего первый крупный шаг в науке, и он по возвращении в Копенгаген из командировки в США оставил постоянное место работы в Институте сывороток, покинул семью и переехал в Женеву на работу в ВОЗ.

Йерне, конечно, как исследователь не был сторонним наблюдателем и вместе с основными разработчиками клонально-селекционной доктрины напечатал ряд работ в поддержку своей исходной базовой теории [24, 26,

29]. В их числе была часто цитируемая работа 1966 года «Теория естественного отбора в антителиобразовании: десять лет спустя» в сборнике по случаю 60-летнего юбилея М. Дельбрюка, открывшего Нильсу Йерне дорогу в большую науку [29].

1967 год стал решающим в утверждении клонально-селекционной теории, когда на симпозиуме в Колд Спринг Харборе (Нью-Йорк, США), посвященном антителям, были единодушно признаны все ее главные постулаты и приведены экспериментальные факты, полученные иммунологами и молекулярными биологами. Выступивший с докладом Ф. Бернет [8] заявил, что селекционная теория является центральной догмой иммунологии, а Нильса Йерне назвал ее «единственным отцом» («*only begotten*», по Шекспиру). В свою очередь, Йерне всегда подчеркивал, что его теория, возможно, была бы забыта, если бы не привлекла внимание Бернета, что привело к разработке клонально-селекционной теории. На указанном симпозиуме Йерне выступил с заключительным докладом «Резюме: в ожидании конца», в котором подвел итоги исследования проблемы антителиобразования к тому времени [27].

Перечисленные факты и события способствовали международному признанию приоритета Н. Йерне в одном из фундаментальных открытий в иммунологии. Это и предопределило выбор компании Хоффманн ла Рош, которая в 1969 г. предложила ему организовать и возглавить Институт иммунологии в Базеле. 11-летнее директорство (до ухода с поста в 1980 г.) было очень плодотворным: было создано уникальное учреждение с большим штатом (150 человек), стимулировавшее прогресс научно-методических знаний в области иммунологии. Создание такого института в Европе было давней мечтой датского ученого, которого отнюдь не восхищала абсолютная гегемония США в этой сфере. Как оказалось, данное мероприятие стало делом в нужное время и в нужном месте. Достаточно напомнить, что три его сотрудника за сравнительно короткий срок были удостоены Нобелевской премии: кроме Н. Йерне, Г. Келер и С. Тонегавы. Успех Базельского института во многом был обусловлен той благожелательной творческой атмосферой, которую создал директор, уже немолодой, поработавший в ряде научных учреждений и университетов Европы и США, знавший плюсы и минусы бюрократической управленческой машины и сумевший найти оптимальные решения для поддержки развития иммунологии. Он не придерживался жесткой иерархии, а давал свободу всем, кто хотел активно работать, особенно молодым. Такой стиль не разделялся многими, хотя

ни для кого не секрет, что в подобной манере трудились коллективы Н. Бора, А. Райта и др., результативность которых общеизвестна. Чаще же всего в науке практикуется авторитарный тип руководства, иногда иронически именуемый «просвещенной монархией».

Второе существенное достижение Йерне касается разработки теории соматической генерации разнообразия антител при иммунной защите и теоретического рассмотрения роли главного компонента гистосовместимости (МНС) в иммунном ответе [22, 31]. При анализе проблемы «свой-чужой» им было предсказано, что распознавание лиганда рецепторами лимфоцитов наследственно связано с МНС. То есть эта идея возникла до открытия в 1974 году П. Догерти и Р. Цинкернагелем феномена МНС-рестрикции при Т-клеточном распознавании. Позднее в 1978 г. Н. Йерне с коллегами из Базельского института иммунологии напечатали статью с экспериментальным подтверждением предсказания об указанной роли МНС [49]. Положения теории соматической генерации вызвали дискуссии среди коллег. Часть из них получила развитие, например, в работах С. Тонегавы середины 1970-х годов, которые привели к открытию механизма соматической рекомбинации, позволяющей небольшому числу генов кодировать миллионы специфических антител (за это Тонегавы получил Нобелевскую премию в 1987 г.).

Третий важный теоретический вклад Йерне связан с его известной теорией (точнее, гипотезой) идиотипических сетей, которую он изложил в публикации 1974 года [32], а затем неоднократно обращался к ней [23, 25] (правда, для исторической точности следует указать, что основы своей новой теории он изложил в статье 1973 года, напечатанной в «*Scientific American*» [28]). В ней он оставался верен себе при создании новых концепций: примат в механизмах иммунных реакций он отводил внутренним преформированным системам. В теории идиотипических сетей он развивал идею существования саморегулируемой сетевой системы, в которой одно антитело распознает другое антитело («анти-антитело»), а то, в свою очередь, распознает следующее антитело («анти-анти-антитело») и т.д. В данном случае он исходил из того, что молекулы антитела также содержат антигеноподобные компоненты (идиотипы), которые могут взаимодействовать с другим антителом (антиидиотипом), давая возможность любому антителу распознавать другое антитело как антиген. Применял он и другую терминологию: каждая переменная область молекулы антитела (паратоп) функционирует как специфическая антигенная детерминанта (эпитоп), который распознается еще рядом других паратопов, действующих, в свою очередь, как специфические эпитопы, и

т.д. Процесс может длиться бесконечно. Йерне проводил аналогию между иммунной системой и зеркальным залом и на этом строил свои рассуждения. То есть полагалось, что идиотипическая сеть автономна, самодостаточна и не нуждается во внешних стимулах, чтобы эффективно работать. В норме эта сеть сбалансирована, однако при воздействии презентируемого антигена запускается иммунный ответ. Данная концепция уже тогда не получила полной поддержки в среде иммунологов. Больше того, теория идиотипических сетей подвергалась сильной критике, особенно со стороны его давнего оппонента Мелвина Кона. В настоящее время интерес к ней снизился. Тем не менее именно разработка теории идиотипической сети послужила по времени ее появления формальным поводом для присуждения Нобелевской премии Йерне.

Практическая разработка Йерне так же, как и его теории, была широко востребованной. В период пребывания в Питтсбургском университете в 1963 году он вместе с постдокторантом Э. Нординым предложил метод подсчета количества антителообразующих клеток с помощью локального гемолиза в агаре [17]. Процедура состояла в определении числа антителообразующих плазматических клеток в общей популяции лимфоидных клеток с помощью подсчета зон локального гемолиза, возникающего после внесения пробы в агар вместе с эритроцитами и комплементом (из-за продукции антиэритроцитарных антител плазматическими клетками). Метод применялся в течение многих лет, пока на смену ему не пришли более совершенные технические возможности [3].

Присуждение Нобелевской премии. Отдельно нужно коснуться церемонии вручения Нобелевской премии. Как уже указывалось выше, премия по физиологии и медицине 1984 года была вручена трем лауреатам за «теории, касающиеся специфичности в развитии и регуляции иммунной системы и открытие принципа производства моноклональных антител». Половиной премии за свои теории был удостоен Нильс Йерне, а вторую половину премии получили Георг Келер и Сезар Мильштейн за разработку техники получения гибридом. Йерне было уже 73 года — это была оценка тридцатилетней работы после старта в 40 лет. Ясно, что Нобелевский комитет, присуждая премию Йерне, имел в виду всю совокупность его работ и громадный фактический вклад в иммунологию, которая к 1980-м годам набирала силу и находилась в центре внимания (кстати, это была 13-я по счету премия по иммунологии за 84 года ее присуждения).

На самой процедуре награждения необходимо остановиться особо, поскольку именно от нее пошла классификация открытий Нильса Йерне в виде триады:

теория естественного отбора в антителообразовании — теория соматической генерации разнообразия антител — теория идиотипической сети в иммунной системе. Это сделал шведский профессор Ханс Вигцель (иммунолог по специальности) при представлении лауреатов [50]. Он кратко охарактеризовал все три теории датского ученого, подробнее всего изложив теорию идиотипических сетей и подчеркнув значение зеркальных копий антител для иммунизации.

Йерне выступил на нобелевских торжествах с лекцией «Генерирующая грамматика иммунной системы», в которой со свойственной ему сжатой манерой и минимальным цитированием собственных работ изложил суть своих теорий, с акцентом на идиотипические сети (последние по времени разработки). Заимствуя принципы лингвистики и составляя из букв предложения со стороны антител и антигенов, он подчеркивает, что «предложения, представляющие антитела, имеют частичные зеркальные отображения в предложении антигена. Эти антитела не являются откликом на внедрившийся антиген, а уже имеются в распоряжении животного в его наборе В клеток до того, как поступил антиген. Это важный вывод в развитие теории естественного отбора, введенной в иммунологию в 1950-е годы» [25, с. 222]. Заключение, которое следует из такой возможности, — это то, что «в динамичном состоянии наша иммунная система главным образом саморегулируема и генерирует антиидиотипические антитела к своим собственным антителам, которые составляют [«constitute»] подавляющее большинство антигенов, присутствующих в теле. Система также поддерживает относительное равновесие с другими нормальными составными частями нашего тела, однако живо реагирует на внедрение в наше тело чужеродных частиц, белков, вирусов или бактерий, которые иногда нарушают динамическую гармонию системы» [25, с. 223].

Характерна речь ученого на банкете [21]. И здесь он выглядел весьма оригинальным. Перед шведской аудиторией, не рискуя быть непонятым, он прочел на датском языке отрывок из стихотворения известного датского поэта Йеппе Окьера (Jerre Aakjær, 1866–1930), в котором говорится о воспоминаниях сына об ушедших из жизни родителях. И в этом, как и в своих знаменитых теориях, он оказался не таким, как все.

Награды. Исследователь подобного уровня, конечно, был отмечен многими высокими наградами и званиями. Среди них, кроме Нобелевской премии, наиболее значимым является членство в Британском Королевском обществе (с 1980 г.). Он был также членом Датской Королевской академии наук (1969), иностранным членом

Национальной академии наук США (1975), членом Академии наук Института Франции (1981), почетным членом Института Роберта Коха (Берлин) (1966), почетным членом Британского общества иммунологов (1983), доктором *honoris causa* ряда европейских и американских университетов и др. Йерне был награжден премией Пауля Эрлиха (Франкфурт) (1982), получил международную награду Гарднеровского фонда (1970) и т.д.

Особенности характера. Стиль работы Йерне отличался склонностью к философии, постановке теоретических проблем. Философский склад ума накладывал отпечаток на его практические действия. Его философские взгляды во многом определяли его научные подходы и логические суждения. С юности он увлекался Ницше, в зрелом возрасте — экзистенциализмом. Особенно ему импонировал датский философ Сёрен Кьеркегор (1813—1855), труды которого он хорошо знал и часто цитировал [44]. Естественно, многое в его философских воззрениях восходит к древним грекам, в частности, к Сократу, у которого Йерне искал ответы на трудные вопросы познания истины. Большое влияние на датского ученого, помимо классиков (Дарвин и др.), оказал английский статистик и генетик Р.Э. Фишер, идеи которого вдохновляли Йерне. Хотя в своих теориях он не признавал предшественников. Тем не менее у каждой теоретической доктрины Йерне имелись исходные позитивные факты или неоформленные предшествующие идеи. В отношении селекционной теории, как уже указывалось, он располагал собственными экспериментальными подтверждающими данными. В теории соматической генерации разнообразия антител он оперировал всей суммой достижений молекулярной биологии и иммунологии на тот период. Что касается теории идиотипических сетей, то здесь его подкрепляли находки Генри Кункеля (1963) и Жака Удена (1963) (Йерне их упоминает в своей Нобелевской речи — цит. по [25]) о том, что специфические антитела обладают антигенными детерминантами (идиотипами). Основаниями для последней теории служили также положения теории систем, информатики, лингвистики.

Будучи директором Базельского института иммунологии, он не посещал экспериментальные лаборатории, предпочитая семинары и свободные дискуссии. Сам он относил себя к типу людей, которые медленно воспламеняются (по-немецки «*Spaetzuender*»). В молодости увлекался шахматами. В совершенстве знал несколько европейских языков (лучше всего — голландский, что неудивительно, поскольку с трех лет жил в Нидерландах, учился и окончил среднюю школу в Роттердаме). Не замыкался в рамках своей профессии: например, любил

искать сходство в организации иммунной и нервной систем (на этот счет у него есть специальная публикация 1975 года — см. список литературы [4]).

Публикации автора, биографии. Н. Йерне написал немного работ — около 70. Один из достаточно полных доступных списков помещен в PubMed [51] — 45 источников, из них 11 извлекаются в полнотекстовом варианте. Специальный том наиболее значимых избранных работ Йерне был подготовлен его коллегой по Базельскому институту иммунологии Иваном Левковичем [4]. В этой же книге имеется фактически полный список публикаций Йерне из 68 работ [4, р. 59—65], а также факсимиле его писем. Существует довольно многочисленная литература с биографиями ученого — в основном кратких, аннотационного характера. Среди них наибольшую ценность представляет книга Т. Содерквиста, написанная после изучения им архивных фондов Йерне — в оригинале она на датском языке [43] и есть перевод на английский язык [44]. Издание на датском языке вышло под названием «От какой борьбы бежать?». Оно было заимствовано у английского поэта-романтика начала XIX века Джона Китса (1795—1821) из его «Оды греческой вазе» (написана в 1819 г.), в которой были следующие строки: «*What maiden loth?*», «*What mad pursuit?*», «*What struggle to escape?*» («Что за противящиеся девы?», «Что за безумная погоня?», «От какой борьбы бежать?»). Известно, что Ф. Крик назвал свою автобиографию, используя второе из этих предложений — «Что за безумная погоня?» [11]. Т. Содерквист взял для своей биографической книги о датском ученом третье предложение из приведенного списка с согласия Йерне. Однако незадолго до смерти последний отказался от такого наименования, сославшись, что он не хотел бы быть вторым после Крика. Тем не менее Содерквист оставил прежнее, согласованное ранее название в датском издании, а в английском дал новое — «Наука как автобиография: беспокойная жизнь Нильса Йерне». У Содерквиста имеются еще публикации, посвященные творчеству Н. Йерне, например [41, 42]. Из других биографических исследований следует указать на [1, 2, 5, 15, 16, 36, 40, 48].

Литература

1. Лауреаты Нобелевской премии: Энциклопедия: А—Л / Пер. с англ. — М.: Прогресс, 1992. — С. 442—444.
2. *Марьянович А.Т., Князькин И.В.* Взрыв и цветение. Нобелевские премии по медицине 1901—2002. — СПб.: Издательство ДЕАН, 2003. — С. 403—411.
3. *Ройт А.* Основы иммунологии / Пер. с англ. Под ред. Р.Г. Василовой и А.Ф. Киркина. — М.: Мир, 1991. — 328 с.

4. A Portrait of the Immune System: Scientific Publications of N.K. Jerne (World Scientific Series in 20th Century Biology, Vol. 2) / Ed. by Ivan Lefkovits. – World Scientific Pub. Co Inc., 1997. – 877 p.
5. *Askonas B.A. & Howard J.G.* Niels Kaj Jerne. 23 December 1911 – 7 October 1994 // Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society. – 1997. – Vol. 43. – P. 235–251.
6. *Burnet F.M.* A modification of Jerne's theory of antibody production, using the concept of clonal selection // Aust. J. Sci. – 1957. – Vol. 20. – P. 67–69.
7. *Burnet F.M.* The clonal selection theory of acquired immunity. – Nashville, TN: Vanderbilt University Press, 1959. – XIII, 209 p.
8. *Burnet F.M.* The impact on ideas of immunology // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. – 1967. – Vol. 32. – P. 1–8.
9. *Burnet F.M.* The production of antibodies: A review and theoretical discussion monograph from the Walter and Elisa Hall Institute of Research in Pathology and Medicine, No 1. – Melbourne: Macmillan, 1941.
10. *Burnet F.M., Fenner F.* The production of antibodies. 2nd ed. Monograph of Walter and Elisa Hall Institute. – Melbourne: Macmillan, 1949.
11. *Crick F.* What mad putsuit? A personal view of scientific discovery. – New York: Basic Books, 1988. – XIII, 182 p.
12. *Ehrlich P.* On immunity with special reference to cell life // Proceedings of the Royal Society (London). – 1900. – Vol. 66. – P. 424–448.
13. *Haurowitz F.* Immunochemistry // Ann. Rev. Biochem. – 1960. – Vol. 29. – P. 609–634.
14. *Haurowitz F.* The mechanism of the immunological response // Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. – 1952. – Vol. 27. – P. 247–280.
15. *Hoffmann G.W.* Niels Jerne Obituary: Niels Jerne, Immunologist, 1911–1994 // Vaccine Research. – 1994. – Vol. 3. – N 4. – P. 173–174.
16. Interviews with Nobel Prize winning scientists: Niels Jerne [Электронный ресурс]: <http://www.bbc.co.uk/archive/scientists/10605.shtml> (дата обращения – 27.06.2011).
17. *Jerne N.K. & Nordin A.A.* Plaque formation in agar by single antibody-producing cells // Science. – 1963. – Vol. 140. – N 3565. – P. 305.
18. *Jerne N.K.* 25 years, Basel Institute for Immunology: Annual report introductions. – Editiones Roche, 1996. – 455 p.
19. *Jerne N.K.* A study of avidity based on rabbit skin responses to diphtheria toxin-antitoxin mixtures // Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl. – 1951. – Suppl. 87. – P. 1–183.
20. *Jerne N.K.* Autobiography [Электронный ресурс]: www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1984/jerne-autobio.html (дата обращения – 18.06.2011).
21. *Jerne N.K.* Vanquet speech [Электронный ресурс]: www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1984/jerne-speech.html (дата обращения – 18.06.2011).
22. *Jerne N.K.* Generation of antibody diversity and self tolerance – a new theory / In: R.T. Smith and M. Landy (Eds.). Immune surveillance. – New York: Academic Press, 1970. – P. 343–363.
23. *Jerne N.K.* Idiotypic networks and other preconceived ideas // Immunological Reviews. – 1984. – Vol. 79. – P. 5–24.
24. *Jerne N.K.* Immunological speculations // Annu. Rev. Microbiol. – 1960. – Vol. 14. – P. 341–358.
25. *Jerne N.K.* Nobel lecture. The generative grammar of the immune system [Электронный ресурс]: www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1984/jerne-lecture.pdf (дата обращения – 18.06.2011).
26. *Jerne N.K.* Selective theories on antibody formation // Arb. Paul Ehrlich Inst. Georg Speyer Haus Ferdinand Blum Inst. Frankf. – 1962. – Vol. 57. – P. 1–14 (German).
27. *Jerne N.K.* Summary: Waiting for the end // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. – 1967. – Vol. 32. – P. 591–603.
28. *Jerne N.K.* The immune system // Scientific American. – 1973. – Vol. 229(1). – P. 52–60.
29. *Jerne N.K.* The natural selection theory of antibody formation; ten years later / In: Phage and the Origins of Molecular Biology. J. Cairns, G.S. Stent & J.D. Watson (Eds.). – Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory of Quantitative Biology, 1966. – P. 301–312.
30. *Jerne N.K.* The natural-selection theory of antibody formation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1955. – Vol. 41(11). – P. 849–857.
31. *Jerne N.K.* The somatic generation of immune recognition // European J. of Immunology. – 1971. – Vol. 1. – P. 1–9.
32. *Jerne N.K.* Towards a network theory of the immune system // Annales d'Immunologie (Paris). – 1974. – Vol. 125C. – P. 373–389.
33. *Lederberg J.* Genes and antibodies. Do antigens bear instructions for antibody synthesis or do they select cell lines that arise by mutations? // Science. – 1959. – Vol. 129. – P. 1649–1653.
34. *Lederberg J.* Ontogeny of the clonal selection theory of antibody formation. Reflections on Darwin and Ehrlich // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1988. – Vol. 546. – P. 175–187.
35. *Lederberg J.* The landmark interviews. The genetic control of antibody synthesis // J. of NIH Research. – 1994. – Vol. 6. – P. 72–80.
36. Niels Kaj Jerne [Электронный ресурс]: www.en.wikipedia.org/wiki/Niels_Kaj_Jerne (дата обращения – 18.06.2011).
37. *Nossal G.J.V. and Lederberg J.* Antibody production by single cells // Nature. – 1958. – Vol. 181. – P. 1419–1420.
38. *Pauling L.* A theory of the structure and process of formation of antibodies // J. Am. Chem. Soc. – 1940. – Vol. 62. – P. 2643–2657.

39. *Pauling Linus and Delbrueck Max*. The nature of intermolecular forces operative in biological processes // *Science*. — 1940. — Vol. 92. — P. 77–79.
40. *Silverstein A.M.* History of immunology. A history of theories of antibody formation // *Cell Immunol*. — 1985. — Vol. 91. — P. 263–283.
41. *Soderqvist T.* The life and work of Niels Kaj Jerne as a source of ethical reflection // *Scandinavian J. of Immunology*. — 2002. — Vol. 55. — N. 6. — P. 539–545.
42. *Soderqvist Th.* Darwinian overtones: Niels K. Jerne and the origin of the selection theory of antibody formation // *J. of the History of Biology*. — 1994. — Vol. 27. — N 3. — P. 481–529.
43. *Soderqvist Th.* Hvilken kamp for at undslippe. — Copenhagen: Borgen, 1998.
44. *Soderqvist Th.* Science as Autobiography. The Troubled Life of Niels Jerne. — New Haven, Conn.: Yale University Press, 2003. — 384 p.
45. *Talmage D.* The acceptance and rejection of immunological concepts // *Ann. Rev. Immunol.* — 1986. — Vol. 4. — P. 1–11.
46. *Talmage D.W.* Allergy and immunology // *Ann. Rev. Med.* — 1957. — Vol. 8. — P. 239–256.
47. *Talmage D.W.* Immunological specificity. Unique combinations of selected natural globulins provide an alternative to the classical concept // *Science*. — 1959. — Vol. 129. — P. 1643–1648.
48. The immune system: Festschrift in honor of Niels Kaj Jerne, on the occasion of his 70th birthday (v. 1) / Ivan Lefkovits, C.M. Steinberg (Eds.). — S. Karger AG (Switzerland), 1981. — 440 p.
49. *Von Boemer H., Haas W., and Jerne N.K.* Major histocompatibility complex-linked immune-responsiveness is acquired by lymphocytes of low-responder mice differentiating in thymus of high-responder mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1978. — Vol. 75. — N. 5. — P. 2439–2442.
50. *Wigzell H.* The Nobel prize for physiology or medicine / In: *Les Prix Nobel 1984: Nobel Prizes, Presentations, Biographies and Lectures*. — Stockholm: Almqvist and Wicksell International, 1985. — P. 24–27.
51. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Jerne%20NK (дата обращения — 30.07.2011).

Резюме. В связи со 100-летним юбилеем со дня рождения Нильса Йерне, выдающегося иммунолога, лауреата Нобелевской премии, проводится анализ его жизни и деятельности.

Ключевые слова: история науки, иммунология, биографии, Нильс Кай Йерне.

ON THE 100TH ANNIVERSARY OF THE BIRTH OF THE PROMINENT IMMUNOLOGIST NIELS JERNE

O.V. VOROBYEVA

Institute of Immunology, Yu.A. Ovchinnikov Russian Biotechnological Society, Moscow

In connection with the 100th anniversary of the birth of Niels Jerne, a prominent immunologist and Nobel Prize winner, examines his life and work.

Keywords: history of science, immunology, biography, Niels Kaj Jerne.

СОБЫТИЯ ПЕРВОЙ ПОЛОВИНЫ 2011 ГОДА

**Круглый стол в Государственной Думе ФС РФ
«О совершенствовании законодательного
обеспечения сохранения биологических коллекций
для развития биотехнологической отрасли
Российской Федерации»
(Москва, 9 июня 2011 г.)**

9 июня 2011 года в Москве, в Государственной Думе Федерального Собрания Российской Федерации состоялся круглый стол «О совершенствовании законодательного обеспечения сохранения биологических коллекций для развития биотехнологической отрасли Российской Федерации». Организатор — Комитет Государственной Думы по науке и наукоемким технологиям. В результате обсуждения были приняты следующие рекомендации.

Обсудив состояние и перспективы совершенствования законодательного обеспечения деятельности, связанной с биологическими коллекциями и направленной на развитие биотехнологической отрасли Российской Федерации, участники круглого стола в составе депутатов Государственной Думы, членов Совета Федерации, представителей федеральных органов исполнительной власти, исполнительных и законодательных органов власти субъектов Российской Федерации, органов местного самоуправления, руководителей научно-исследовательских учреждений, коммерческих и некоммерческих предприятий, общественных организаций, средств массовой информации отмечают.

Сохранение и развитие биологических коллекций на территории РФ является частью приоритетной межведомственной и междисциплинарной проблемы сохранения биоресурсов, биоразнообразия, укрепления био- и продовольственной безопасности государства, решение которой служит основой устойчивого развития российской науки в целом, современных наукоемких производств, подготовки квалифицированных кадров. Во многих странах мира вопрос о сохранении и рациональном использовании генетических ресурсов определен в качестве приоритетной государственной задачи на законодательном, экономическом, научно-организационном и производственном уровнях.

Данная проблема требует проработки по всем аспектам: фундаментальным, образовательным, правовым, экономическим, политическим, международным и т.д. Участники круглого стола констатировали, что сохранение генетических ресурсов и профессиональная

работа по поддержанию биологических коллекций являются основой успешного развития современной биотехнологии, фармацевтической промышленности, сельского хозяйства и других отраслей экономики, определяющих поступательное социально-экономическое развитие страны, повышение качества жизни населения, обеспечение ее продовольственной и биологической безопасности.

Россия обладает уникальной биоресурсной базой: 25% мировых запасов леса, а также аква- и мариресурсы, уникальные по разнообразию флора, фауна и микробиота. Обладая этими богатствами, отечественные специалисты на протяжении многих лет осуществляли последовательную деятельность по формированию биологических коллекций, а также созданию национальных заповедников и охраняемых территорий. К их числу следует отнести беспрецедентную по своему научному и практическому значению Вавиловскую коллекцию генетических ресурсов растений ВНИИР РАСХН, сохраняемую в Санкт-Петербурге и Краснодаре и высоко оцениваемую мировыми специалистами в данной области. К объектам особого внимания государства и общества могут быть отнесены ценные биологические коллекции, созданные в профильных НИИ и ведущих университетах страны, например, коллекции микроорганизмов (Всероссийская коллекция микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пушкино; Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов, ГосНИИгенетика, Москва; Коллекция морских микроорганизмов, Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток; Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь), коллекции флоры и фауны (Главный ботанический сад РАН, Москва; Ботанические сады МГУ им. М.В. Ломоносова и Санкт-Петербурга), а также биологические коллекции Лимнологического института РАН (Иркутск), Томского университета и др., которые, по сути, представляют собой национальное достояние России.

Самостоятельную научно-практическую проблему представляет собой сохранение коллекций, поддерживающих основные фонды микроорганизмов в Российской Федерации. Часть из них функционирует несколько десятилетий (ВКПМ, ВКМ и др.). В последнее время растет интерес к изучению, возможному использованию, физическому обладанию биологическими коллекциями. Этому способствовало провозглашение принципа национального суверенитета в отношении генетических ресур-

сов Конвенцией о биоразнообразии (ратифицированной РФ в 1995 г.). С учетом этого принципа разрабатываются и уточняются международные правовые механизмы доступа к генетическим ресурсам (Кодекс МОСАИСС, Боннское руководство, Нагойский протокол 2010), трансграничным перемещениям ГМО (Картахенский протокол), оформлению депонирования (Практический Кодекс по депонированию, ВОИС). Опубликованы также документы ОЭСР, касающиеся биологических ресурсных центров (БРЦ), новое издание Руководства для коллекций культур Всемирной федерации коллекций культур и другие важные для деятельности коллекций материалы.

Существенно, что Российская Федерация продекларировала свои намерения интегрироваться в мировую систему экономических и правовых отношений (вступить в ВТО и ОЭСР).

БРЦ представляют собой важнейший элемент инфраструктуры, обеспечивающий развитие биотехнологии и биологической науки, лежащей в ее основе. БРЦ — это организации, предоставляющие услуги по хранению живых клеток, геномов и биоинформации, имеющей отношение к наследственности, функционированию биологических систем и различным аспектам практического использования биоматериалов. В состав БРЦ входят коллекции культивируемых организмов, их воспроизводимых частей (геномов, плазмид, вирусов, образцов ДНК), жизнеспособных, но пока не культивируемых организмов, клеток и тканей, а также базы данных о поддерживаемых ресурсах. Все эти виды деятельности, по мнению ОЭСР, должны иметь место в биологических ресурсных центрах, объединенных в общеевропейскую и мировую системы.

В мире уже существует довольно много действующих БРЦ в виде национальных структур (США, Германия, Бельгия, Франция, Япония, Китай, Бразилия и др.) — с уникальными техническими возможностями хранения, исследований и информационного сопровождения биообъектов.

На фоне мировых процессов и курса страны на развитие инновационной экономики задача создания биологических ресурсных центров в России видится актуальной и безальтернативной. Однако пока не решен вопрос о том, сколько их должно быть и как они могут быть созданы: путем трансформации существующих коллекций при значительном улучшении качества; путем агломерации существующих коллекций; путем создания надстройки над существующими коллекциями по примеру бельгийских координированных коллекций; путем создания с нуля.

В России зарегистрировано около 100 коллекций культур микроорганизмов, принадлежащих различным учреждениям (10 ведомств). Действующие коллекции существенно различаются по объему и качеству фондов, профилю текущей работы, кадровому составу специалистов и уровню стабильности существования.

Суммарный состав коллекционных фондов России охватывает практически все известные группы микроорганизмов — бактерии (включая археи), грибы (включая дрожжи), микроскопические водоросли, простейшие, вирусы (включая фаги). Крупнейшими коллекциями микроорганизмов России являются коллекции ВКМ РАН и ВКПМ, в которых хранится в общей сложности более 30000 штаммов; более 7000 штаммов в каждой из упомянутых коллекций находятся в открытом доступе (открытый каталожный фонд). Широко известны коллекции ВНИИСХМ, ВИЗРа, а также коллекция базидиальных грибов Ботанического института РАН. Указанные коллекции могут рассматриваться в качестве возможной основы для организации в России биологических ресурсных центров.

Во Всероссийском научно-исследовательском институте животноводства Россельхозакадемии (ВИЖ) сформирована и поддерживается коллекция семени редких, уникальных и исчезающих видов животных, во Всероссийском научно-исследовательском и технологическом институте птицеводства (ВНИТИП) создана самая крупная в мире биокolleкция птицы, насчитывающая 86 генофондных единиц. В экспериментальном хозяйстве ВНИИ генетики и разведения животных уникальный генофонд насчитывает 29 редких пород и 10 новых популяций кур селекции института, во Владимирском НИИСХ сохраняется 23 породы гусей, на Северокавказской зональной опытной станции — 8 пород индеек, на птицеводстве «Благоварский» — 8 резервных линий уток. Во Всероссийском научно-исследовательском институте коневодства (ВНИИК) более 30 лет сохраняется биоматериал выдающихся жеребцов-производителей различных пород лошадей. Локальные биокolleкции поддерживаются и в ряде других институтов Россельхозакадемии.

Очевидно, что сценарий одномоментного превращения сотен существующих коллекций в БРЦ не представляется реальным. Скорее всего, это будет процесс, состоящий из ряда этапов, для которых потребуются определить цели, характер, содержание и соответствующие формы. Концепция биоресурсных центров ОЭСР может быть взята за основу для подготовки нормативно-правовых актов, регулирующих деятельность российских национальных коллекций генетических ресурсов.

Вопросы сохранения биологических коллекций и генетических ресурсов страны в целом, в том числе создания условий для их оптимального использования в хозяйственной деятельности, еще недостаточно осознаются как органами государственной власти, так и обществом, в результате чего в РФ отсутствует четкая государственная политика по этому вопросу. Особенно серьезный дефицит ощущается в законодательном обеспечении деятельности в данной сфере, в финансировании, в кадрах и др.

Нуждается в серьезной юридической проработке вопрос об интерпретации суверенных прав государства на генетические ресурсы, формах собственности на них, допустимых Конституцией и Гражданским Кодексом РФ, а также де-факто реализуемых в настоящее время в практической деятельности коллекций, оперирующих в рамках различных ведомств, государственных академий, бизнес-структур и т.д. Полная ясность в этом вопросе, а равно должное правовое оформление всех этапов в цепочках переуступки (прав пользования) физической и интеллектуальной собственности на реплики коллекционных образцов должны сделать процесс оборота генетических ресурсов прозрачным и предельно ясным для всех участников процесса. Права и обязанности учредителей коллекций должны получить четкие юридические, а также административные и финансовые обоснования.

Таким образом, решение вышеуказанных проблем требует принятия комплексных мер государственного регулирования, включая законодательное, для эффективного и отвечающего международным стандартам и соглашениям, ратифицированным Российской Федерацией, использования биологических ресурсов в промышленной биотехнологии.

В целях обеспечения сохранения и развития биологических коллекций для биотехнологической отрасли РФ участники круглого стола рекомендуют:

1. Государственной Думе, Совету Федерации Федерального Собрания Российской Федерации:

1.1. Обеспечить разработку и принятие федеральных законов:

- «Об обороте генетических ресурсов»;
- «О государственной политике Российской Федерации в сфере биотехнологии».

2. Правительству Российской Федерации:

2.1. Создать межведомственную комиссию по биологическим коллекциям для осуществления следующих функций:

- проведение инвентаризации действующих биологических коллекций, включая микроорганизмы, грибы, растения, животных;

- определение перечня коллекций, уполномоченных осуществлять от имени государства депонирование для целей национальной патентной процедуры, а также утверждение Правил по депонированию;

- разработка комплекса мер по созданию сети биологических коллекций РФ с перспективой их последующей интеграции в Европейскую и Глобальную (мировую) информационные сети БРЦ (GBRCN), в соответствии с рекомендациями ОЭСР;

- разработка комплекса мер по реорганизации крупнейших биологических коллекций РФ в национальные биоресурсные центры в соответствии с рекомендациями ОЭСР;

- разработка и утверждение Положения о типовом биоресурсном центре.

2.2. Просить Министерство промышленности и торговли Российской Федерации, Федеральную таможенную службу усовершенствовать процедуры экспортного и импортного контроля за движением биологических материалов, касающиеся, в том числе сокращения сроков и упрощения оформления документации по коллекционному и некоммерческому научному обмену и импорту непатогенных организмов (не включенных в существующие ограничительные списки), снятия ограничений на экспорт выделенных из почв организмов — с учетом сложившейся международной практики.

2.3. Разработать и реализовать меры государственной поддержки существующих биологических коллекций (в будущем — биоресурсных центров), включая:

- обеспечение долгосрочного гарантированного финансирования;

- налоговые льготы;

- усовершенствование таможенного регулирования при передаче или обмене коллекционными биоматериалами, с учетом международного опыта.

2.4. Гармонизировать ныне действующее российское и международное правовое регулирование деятельности по обороту генетических ресурсов и биологических коллекций.

2.5. В формируемой в настоящее время Правительством Российской Федерации государственной программе развития биотехнологии до 2020 г. предусмотреть раздел о биологических коллекциях и национальных биоресурсных центрах.

3. Органам государственной власти субъектов Российской Федерации:

3.1. Обеспечить нормативно-правовую, организационную и экономическую поддержку деятельности

региональных биологических коллекций и биоресурсных центров.

3.2. Вплоть до нормализации деятельности коллекций в связи с проведением вышеуказанных мероприятий ввести мораторий на проведение органами региональной власти любых мероприятий, связанных с изъятием у действующих коллекций земель, зданий, оборудования и биоматериалов.

**IV Научно-практическая конференция
«Пищевая и морская биотехнология —
для здорового питания и решения
медико-социальных проблем»
(г. Светлогорск Калининградской области,
1–2 июля 2011 года)**

1–2 июля 2011 года в г. Светлогорске Калининградской области состоялась IV Научно-практическая конференция «Пищевая и морская биотехнология — для здорового питания и решения медико-социальных проблем». Конференция была организована Обществом биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова и Калининградским государственным техническим университетом при поддержке Федерального агентства по рыболовству и Союза предприятий биотехнологической отрасли.

Участниками конференции стали представители России, Беларуси, Украины, Германии: специалисты по морской и пищевой биотехнологии, научные работники, практики, ведущие эксперты отрасли, коммерческие и финансовые структуры.

Главная задача конференции — обсуждение приоритетных направлений пищевой и морской биотехнологии, обоснование оптимальных путей развития аквакультуры и морской биотехнологии в России.

С докладами на конференции выступили представители ведущих научных и образовательных учреждений, государственных и коммерческих структур, общественных организаций, в том числе: Калининградского государственного технического университета, Мурманского государственного технического университета, Астраханского государственного технического университета, Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра, Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии, некоммерческого партнерства «Системы и Технологии», Союза переработчиков морепродуктов, ЗАО «Владисарт» (г. Владимир), Запбалтрыбвода (г. Калининград) и др.

В рамках конференции состоялось обсуждение раздела по морской биотехнологии в контексте разраба-

тываемой в настоящее время государственной Программы развития биотехнологии в РФ до 2020 года, а также перспектив формирования технологической платформы по морской биотехнологии и аквакультуре.

По тематике конференции организаторами был издан сборник материалов, посвященный актуальным вопросам пищевой и морской биотехнологии.

После всестороннего обсуждения указанных проблем участниками конференции было принято **РЕШЕНИЕ:**

1. Одобрить участие представителей направления морской биотехнологии и аквакультуры в формируемой государственной Программе развития биотехнологии в РФ до 2020 года.

2. С целью повышения эффективности взаимодействия предприятий и организаций сферы морской биотехнологии и аквакультуры считать целесообразным формирование технологической платформы «Морская биотехнология и аквакультура» (ТП «Морбиотех-2030»).

3. Предложить Обществу биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова выступить координатором работы по формированию ТП «Морбиотех-2030» и взаимодействию с другими технологическими платформами. С этой целью сформировать рабочую группу с участием представителей профильных НИИ, вузов, государственных и коммерческих предприятий, общественных организаций.

4. Широко информировать об итогах конференции профильных работников и заинтересованных смежных специалистов.

5. Провести очередную V конференцию «Морская и пищевая биотехнология» в 2013 г.

ПУБЛИКАЦИИ

Arora H. Illustrated dictionary of biotechnology. — CRC Press, 2009. — 450 p.

Резюме. В словаре собрано большое количество биотехнологических терминов, которое может удовлетворить разных специалистов, обращающихся к этой мультидисциплинарной отрасли (исследователей, клиницистов, студентов, юристов, инвесторов и т.д.). Текст содержит однозначные определения и базовую информацию по всей предметной области биотехнологии. В нем содержатся многочисленные перекрестные ссылки, облегчающие работу со словарем. Способствуют разъяснению материала соответствующие иллюстрации.

Ritter A.B., Hazelwood V., Vandevit A., Ascione A.N. *Biomedical engineering principles. Second edition.* — CRC Press, 2011. — 540 p.

Резюме. Книга состоит из четырех частей. В части I представлен системный анализ, помещены биологические данные, экспериментальные модели, концепции транспортных процессов. В части II приведены данные об обработке сигналов. Часть III посвящена практическим аспектам биомеханики, включая структурно-функциональные основы опорно-двигательного аппарата. В части IV обсуждаются проблемы живых и неживых систем.

Khan F.A. *Biotechnology fundamentals.* — CRC Press, 2011. — 654 p.

Резюме. В руководстве изложены основы биотехнологии, включая последние перспективные направления, такие как стволовые клетки, клонирование, биотопливо, трансгенные растения, генетически модифицированные продукты, фармакогеномика, нанобиотехнология. Книга хорошо построена в дидактическом плане, облегчая восприятие материала с помощью конкретных примеров.

Dogramatzis D. *Healthcare biotechnology. A practical guide.* — CRC Press, 2011. — 689 p.

Резюме. В книге шесть разделов. Она начинается с обсуждения общих проблем, например, защита интеллектуальной собственности, менеджмент, инновации, патентное дело, коммерциализация и т.д. В ней также приводятся современные сведения о механизмах финансирования, выработки стратегий, партнеринга. Отдельно рассматриваются вопросы маркетинга. В руководстве содержатся 40 рисунков, 220 таблиц, 180 библиографических источников, более 1000 PowerPoint слайдов. В каждой главе имеются 10 вопросов и 10 упражнений для закрепления материала.

Mousdale D.M. *Introduction to biofuels.* — CRC, 2010. — 455 p.

Резюме. В книге обсуждается проблема биоэнергетики в широком смысле, в контексте ее технологического, социологического и политического значения. В связи с этим в ней приводятся многочисленные примеры на основе ключевых технологий, в том числе биотехнологии, биопротессинга, генетического перепрограммирования

микроорганизмов. Рассматриваются перспективы развития производства биотоплива в XXI столетии. Книга снабжена вспомогательными материалами обучающего характера (вопросы и ответы по главам).

Roy M.J. *Biotechnology operations: Principles and practices.* — CRC Press, 2010. — 416 p.

Резюме. Автор, используя собственный опыт преподавания в Висконсинском университете (США), дает оптимальные рабочие схемы, применяемые в современной биотехнологии. Делается акцент на стратегическое планирование и эффективный менеджмент.

Buchholz K., Collins J. *Concepts in biotechnology: History, science and business.* — John Wiley & Sons, 2011. — 490 p.

Резюме. Особенностью книги является интегральный взгляд, объединяющий науку с бизнесом в историческом плане. Этому способствует длительный опыт научных исследований автора в различных учреждениях Германии (его интересы лежат в сфере биокатализа, ферментативного синтеза углеводов, экологической биотехнологии). При этом обращается внимание на наиболее приоритетные направления биоиндустрии и реальные механизмы, направленные на ее прогресс.

Clark D.P., Pazdernik N. *Biotechnology: Academic cell update edition.* — ACACL, 2011. — 768 p.

Резюме. Авторы сделали подборку современных журнальных статей по биотехнологии, опубликованных Cell Press к настоящему времени. Дается комментарий составителей во введении к каждой главе.

Kirakosyan A., Kaufman P.B. *Recent advances in plant biotechnology.* — Springer Verlag, 2009. — XVI, 412 p.

Резюме. Издание содержит последнюю информацию по биотехнологии растений, включая ее главные направления: контроль роста и развития растений, защита растений от факторов окружающей среды и биоты, разработка методов получения пищевых, биохимических и фармацевтических продуктов. Предназначено для биологов и биотехнологов растений, биохимиков, молекулярных биологов, фармакологов, фармацевтов, генетиков, агрономов, селекционеров, этноботаников, экологов и др.

Seidman L.A. Basic laboratory methods for biotechnology. — Prentice Hall, Inc., 2009.

Резюме. Книга содержит многочисленные разделы, в которых последовательно приводятся основные лабораторные методы, применяемые в биотехнологии, а также нормативные документы и извлечения из руководств (стандарты, технические регламенты и т.д.). Большая часть посвящена аналитической химии, препаративным особенностям, технологическим деталям.

Kisaalita W.S. 3D cell-based biosensors in drug discovery programs. Microtissue engineering for high throughput screening. — CRS Press, 2010. — 404 p.

Biotechnology in China I. From Bioreaction to Bioseparation and Bioremediation. Series: Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. Vol. 113 / Jian-Jiang Zhong, Feng-Wu Bai, Wei Zhang (Eds.). 1st ed. — Springer Verlag, 2009. — XIII, 322 p.

Walker J., Rapley R. (Eds.). Molecular biology and biotechnology. 5th ed. — Springer Verlag, 2009. — 804 p.

Резюме. Учебник для вузов, в котором факты молекулярной биологии спроецированы на разные ветви биотехнологии. Включены последние достижения в области геномных технологий, нанобиотехнологии, регенеративной медицины, создания лекарств, биотоплива и др.

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 сведения об авторе (ах): Ф.И.О., место работы, должность, научные степень и звание, адреса для переписки и электронной связи, номера факсов и телефонов). Необходимо сопроводительное письмо из учреждения.
3. Объем рукописи: оригинальные статьи — не более 12–14 стр. (в среднем 22000 знаков), не более 25 цитированных авторов; обзоры — не более 20–24 стр. (в среднем 40000 знаков), список литературы — не более 50 авторов. Требования к композиции рукописи: 1) оригинальные статьи — УДК, название, автор (ы), место работы, резюме на русском и английском языках, ключевые слова, введение, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение (выводы), литература, список сокращений; 2) краткие сообщения и обзоры строятся в виде сплошного текста, без вышеуказанных рубрикации, со списком литературы, резюме на русском и английском языках; 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.



Подписано к печати 06.07.11
 Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
 Печать офсетная. Гарнитура Академия.
 Печ. л. 5,0. Тираж 500 экз.

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. Регулярно 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 57 регионах России и объединяет свыше 3000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

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

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

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Адрес: 1190171 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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