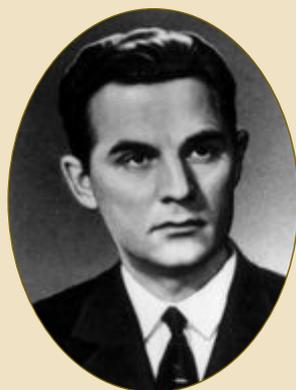


· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

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

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

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



**Т. 7, № 3**  
**2011**

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРДТ ·

2011, Т. 7, № 3

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

**Научно-практический журнал**

**Основан в 2005 году**

**Главный редактор**

Р.Г. Василев

**Редакционная коллегия**

Е.Г. Борисенко, В.С. Воробьев, С.И. Матаев, 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**

Эпигенетическое типирование малигнанных клеточных линий человека с помощью  
BlsI- и GluI-ПЦР-анализа.

*А.Г. Акишев, Д.А. Гончар, М.А. Абдурашитов, С.Х. Дегтярев* ..... 5

Биотехнологические аспекты переработки фибрина — отхода производства гетерологичного  
антирабического иммуноглобулина.

*И.М. Жулидов, Е.Г. Абрамова, М.В. Антонычева, А.К. Никифоров, И.В. Шульгина,  
О.А. Лобовикова, Н.И. Вахрушина, С.А. Еремин, Т.В. Аленкина* ..... 17

Гематопротекторное действие эрдистероидсодержащей субстанции Серпистен.

*Н.А. Мойсеев, Ж.Е. Иванкова, Е.Н. Репина, В.В. Володин* ..... 24

Антиагрегационное и стресс-лимитирующее действие эрдистероидсодержащей субстанции Серпистен.

*Н.Б. Петрова, В.В. Володин* ..... 29

Новая сайт-специфическая метилзависимая ДНК-эндонуклеаза PkrI узнает и расщепляет  
метилированную последовательность ДНК 5'-GCN<sup>^</sup>GC-3'/3'-CG<sup>^</sup>NCG-5', содержащую  
не менее трех 5-метилцитозин.

*В.А. Чернухин, Т.Н. Наякина, Д.А. Гончар, Ю.Э. Томилова, М.В. Тарасова,  
В.С. Дедков, Н.А. Михненко, С.Х. Дегтярев* ..... 35

**Краткие сообщения**

Использование модифицированной атмосферы для сохранения качества соленой продукции  
из лососевых видов рыб.

*С.В. Добренкова, Л.Р. Копыленко, Е.Д. Павлов, Е.В. Ганжа* ..... 43

Организация профессиональной подготовки специалистов по биотехнологии  
в Пермской фармацевтической академии.

*Е.И. Молохова, А.В. Казьянин, Т.А. Шмалько* ..... 47

**Обзоры**

Биотопливо из водорослей — миф или реальность?

*Л.Х. Вафина* ..... 51

Молекулярно-биологические основы аллергенспецифической иммунотерапии.

*О.В. Воробьева, И.С. Гуцин* ..... 54

**Страницы истории**

Юбилейные и знаменательные даты 2011 года ..... 72

**Хроника**

События второй половины 2011 года ..... 77

**Правила для авторов** ..... 79

**CONTENTS**

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

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

**Original articles**

Epigenetic typing of human cancer cell lines by *BlsI*- and *GlaI*-PCR assays.

*A.G. Akishev, D.A. Gonchar, M.A. Abdurashitov, S.Kh. Degtyarev*..... 5

Biotechnological aspects of processing of fibrin – waste production of heterologous rabies immunoglobulin.

*I.M. Zhulidov, E.G. Abramova, M.V. Antonycheva, A.K. Nikiforov, I.V. Shulgin, O.A. Lobovikova, N.I. Vahrushina, C.A. Eremin, T.V. Alenkina*..... 17

Hematoprotective effect of ecdysteroid containing preparation *Serpisten*.

*N.A. Moyseenko, J.E. Ivankova, E.N. Repina, V.V. Volodin* ..... 24

Anti-aggregation and stress-limitation effect of ecdysteroid-containing preparation *Serpisten*.

*N.B. Petrova, V.V. Volodin*..... 29

A new site-specific methyl-directed DNA endonuclease *PkrI* recognizes and cuts methylated DNA sequence 5'-GCN<sup>^</sup>GC-3' / 3'-CG<sup>^</sup>NCG-5' carrying at least three 5-methylcytosines.

*V.A. Chernukhin, T.N. Nayakshina, D.A. Gonchar, Ju.E. Tomilova, M.V. Tarasova, V.S. Dedkov, N.A. Mikhnenkova, S.Kh. Degtyarev* ..... 35

**Short communications**

Use of modified atmosphere to preserve the quality of salted products from salmon fish.

*S.V. Dobrenkova, L.R. Kopylenko, E.D. Pavlov, E.V. Ganja* ..... 43

Provide training on biotechnology in the Perm pharmaceutical academy.

*E.I. Molochova, A.V. Kazyanin, T.A. Shmalko*..... 47

**Reviews**

Biofuels from algae – myth or reality?

*L.H. Vafina* ..... 51

Molecular-biological basis of allergen-specific immunotherapy.

*O.V. Vorobyeva, I.S. Gushchin* ..... 54

**Pages of history**

Anniversary and significant dates 2011 ..... 72

**The chronicle**

Events of the second half-year 2011 ..... 77

**Rules for authors** ..... 79

## К читателям

Третий номер журнала содержит очень интересную подборку статей. Особенно мне хотелось бы отметить публикацию профессора Г.Х. Дегтярева с коллегами из Новосибирска (компания «СибЭнзим»), в которой излагаются данные о возможностях метода эпигенетического типирования малигнанных клеточных линий для изучения теории онкогенеза и потенциального использования в практической онкологии. Помещена также вторая статья от коллектива «СибЭнзим», в которой отражается последовательная линия этой организации на всестороннее изучение рестриктаз.

Безусловный интерес представляет оригинальное сообщение сотрудников Саратовского противочумного института об особенностях научно-исследовательской работы с их грозными биообъектами. В нем авторы делятся своими подходами к культивированию возбудителей особо опасных инфекций в специальных средах на основе гидролизата фибрина.

Уверен, что найдется внимательная читательская аудитория и для обзорной статьи известного отечественного аллерголога члена-корреспондента РАМН И.С. Гущина с коллегой о молекулярно-биологических основах аллерген-специфической иммунотерапии. На материале этого обстоятельного свода современных данных, выстроенных в историческом аспекте, можно воочию убедиться, насколько эффективен вклад генно-инженерных методов в решение актуальных проблем аллергологии — речь идет о рекомбинантных технологиях применительно к диагностике, лечению и профилактике аллергических заболеваний.

В выпускаемом номере продолжается серия публикаций по проблеме адаптогенов, выходящая под эгидой творческого коллектива, возглавляемого профессором В.В. Володиным (Сыктывкар). На этот раз представлены две работы о гематопротекторном и антиагрегационном действии Серпистена, одного из новых препаратов, относящихся к классу фитоэкдистероидов.

Также печатаются краткие сообщения по разным темам, связанным с такой мультидисциплинарной отраслью, как биотехнология: подготовка кадров для биофармацевтики (группа авторов — Е.И. Молохова и др. из Пермской фармацевтической академии), технологии сохранения морепродуктов (С.В. Добренкова — из ВНИРО). Помещается и небольшой обзор Л.Х. Вафиной по важной проблеме получения биотоплива из водорослей.

В заключение я хочу обратить особое внимание читателей на то, что в сентябре 2011 года исполнилось 80 лет со дня рождения академика РАН А.С. Спирина, выдающегося отечественного биохимика, с именем которого связано оригинальное направление мирового уровня, посвященное изучению РНК, рибосом и внеклеточного синтеза белка. Журнал дает биографические материалы в связи с этой датой. От имени редколлегии и редсовета сердечно поздравляю Александра Сергеевича Спирина с замечательным юбилеем.

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

## ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ МАЛИГНАНТНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ BslI- И GlalI-ПЦР-АНАЛИЗА

А.Г. АКИШЕВ, Д.А. ГОНЧАР, М.А. АБДУРАШИТОВ, С.Х. ДЕГТЯРЕВ\*

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Метод BslI- и GlalI-ПЦР-анализа был использован для определения статуса метилирования регуляторных областей генов-онкосупрессоров SEPT9b, IGFBP3, CEBPB, MGMT и RASSF1A в ДНК малигнанных клеточных линий HeLa, Raji, U-937 и Jurkat, а также в контрольной ДНК клеточной линии фибробластов L-68. BslI- и GlalI-ПЦР-анализ показал, что регуляторные области генов-онкосупрессоров RASSF1A, SEPT9b, IGFBP3, CEBPB и MGMT могут как содержать метилированные последовательности 5'-RMGY-3', так и не иметь этих сайтов в зависимости от малигнantly клеточной линии, из которой выделялась ДНК. В ДНК исследованных клеточных линий наблюдались различные комбинации генов-онкосупрессоров с метилированными сайтами. При этом в здоровых клетках линии фибробластов L-68 не было обнаружено сайтов 5'-RMGY-3' ни в одной из упомянутых регуляторных областей. На основе полученных результатов предлагается применять BslI- и GlalI-ПЦР-анализ для эпигенетического типирования малигнantly клеточных линий.

**Ключевые слова:** метилирование ДНК, метилзависимые ДНК-эндонуклеазы, BslI, GlalI, эпигенетика, рак, клеточные линии.

### Введение

Метилирование ДНК в геномах млекопитающих происходит главным образом по CpG-динуклеотидам и приводит к образованию 5-метилцитозиновых остатков (М) в обеих цепях ДНК. Во многих случаях регуляторные участки генов млекопитающих, включающие в себя промоторы и первые экзоны, содержат последовательности ДНК с повышенным содержанием G+C, называемые CpG-островками (Antequera F., 2003) [4]. Метилирование этих островков в регуляторных областях приводит к блокированию транскрипции и является, таким образом, механизмом эпигенетической регуляции активности генов.

В норме для ДНК каждой ткани характерен совершенно определенный набор функционирующих генов, тогда как остальные гены неактивны вследствие метилирования их регуляторных участков. Изменение статуса метилирования генов в той или иной ткани может привести к ее ненормальному функционированию

и возникновению заболеваний, в частности, развитию канцерогенеза (Bird A., 2002) [6]. Известно, что на ранних стадиях канцерогенеза происходит метилирование регуляторных областей ряда генов, являющихся активными в здоровой ткани (de Cáseres I.I. et al., 2007) [8]. Такое ненормальное (абберантное) метилирование было показано для целого ряда генов-онкосупрессоров в опухолевых тканях, причем оно сохраняется и в малигнantly клеточных линиях, полученных из этих тканей [2, 8]. Абберантное метилирование описано для нескольких десятков генов-онкосупрессоров, причем набор модифицируемых генов отличается в различных опухолях и малигнantly клеточных линиях (Mishra D.K. et al., 2010) [22].

Метилирование ДНК de novo у млекопитающих осуществляют ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a и Dnmt3b, которые узнают последовательность 5'-RCGY-3' и модифицируют внутренний CG-динуклеотид (Handa V. et al., 2005) [13]. Прямое определение метилированных цитозинов в регуляторных участках генов-онкосупрессоров в препаратах ДНК из опухолевых тканей выявило наличие консенсусной последовательности 5'-RMGC-3'/3'-YGMG-5' (Kim S. et al., 2008) [21], которая соответствует продукту реакции метилирования ферментами Dnmt3a и Dnmt3b.

Недавно мы разработали метод GlalI- и BslI-ПЦР-анализа, который позволяет определять наличие сайтов 5'-RMGY-3' и 5'-RMGCNGMGY-3', соответственно,

© 2011 г. Акишев А.Г., Гончар Д.А.,  
Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х.

\* **Автор для переписки:**

Дегтярев Сергей Харитонович

д.б.н., НПО «СибЭнзим»

630117 Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2/12

Тел.: 383-333-6854

E-mail: degt@sibenzyme.com

в изучаемом участке ДНК (Гончар Д.А. и др., 2010) [1]. Метод заключается в обработке ДНК метилзависимыми эндонуклеазами *GlaI* или *BlsI* и последующей ПЦР с праймеров, окаймляющих исследуемый фрагмент ДНК. Метод был применен для определения метилированных сайтов в регуляторных областях генов-онкосупрессоров *DAPK1*, *RASSF1A* и *RARB* [1].

В настоящей работе нами был использован *GlaI*- и *BlsI*-ПЦР-анализ для определения наличия сайтов 5'-RMGY-3' и 5'-RMGCNGMGY-3', соответственно, в области промотора и первого экзона генов-онкосупрессоров *SEPT9b*, *IGFBP3*, *CEBPD* и *MGMT* в препаратах ДНК из хорошо изученных малигнанных клеточных линий HeLa, Raji, U-937, Jurkat и из контрольной клеточной линии фибробластов L-68. Нами также проведено более детальное изучение метилирования регуляторного участка гена *RASSF1A* в указанных клеточных линиях.

*BlsI*- и *GlaI*-ПЦР-анализ показал, что изучаемые регуляторные области генов-онкосупрессоров *RASSF1A*, *SEPT9b*, *IGFBP3*, *CEBPD* и *MGMT* могут как содержать последовательности 5'-RMGY-3', так и не иметь этих метилированных сайтов в зависимости от малигнانتной клеточной линии, из которой выделялась ДНК. В исследованных клеточных линиях наблюдались различные комбинации генов-онкосупрессоров с метилированными сайтами. При этом в здоровых клетках контрольной линии фибробластов L-68 не было обнаружено сайтов 5'-RMGY-3' ни в одной из упомянутых регуляторных областей. Полученные результаты свидетельствуют о том, что определение статуса метилирования регуляторных областей генов-онкосупрессоров методом *BlsI*- и *GlaI*-ПЦР-анализа дает возможность как определять, так и дифференцировать малигнанные клеточные линии. То есть, метод *BlsI*- и *GlaI*-ПЦР-анализа может быть применен для эпигенетического типирования малигнанных клеточных линий человека.

## Материалы и методы

**Исследуемые области генома человека.** В работе изучались пять участков ДНК: области промоторов и первых экзонов генов *RASSF1A* (Ras association domain family 1A), *SEPT9b* (septin 9b), *MGMT* (O6-methylguanine DNA methyltransferase), *IGFBP3* (insulin-like growth factor binding protein 3), а также промоторная область гена *CEBPD* (ССААТ/enhancer binding protein, delta).

**Гидролиз геномной ДНК.** В качестве субстратов для ПЦР использовались препараты ДНК, выделенной из пяти клеточных линий: L-68 (контроль, легочные фибробласты), HeLa (аденокарцинома шейки матки), Raji

(лимфома Беркитта), U-937 (гистиоцитарная лимфома) и Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия). Геномная ДНК из линий клеток человека, эндонуклеазы рестрикции *HaeIII*, *TaqI*, *Tu9I*, метилзависимые сайт-специфические эндонуклеазы *BlsI* и *GlaI*, а также HotStart *Taq*-ДНК-полимераза — производства компании «СибЭнзим» (Новосибирск, Россия). ДНК из *Drosophila melanogaster* любезно предоставила Л.П. Захаренко.

5 мкг геномной ДНК расщепляли 50 ед. акт. *TaqI* или *Tu9I* в 50 мкл реакционной смеси в буфере, указанном производителем, при 65 °С в течение 2 ч (предварительная обработка). Фенольную экстракцию и последующую очистку ДНК проводили по стандартной методике (Sambrook J. et al., 2001) [26].

0,1 мкг предварительно обработанной ДНК инкубировали в 20 мкл реакционной смеси, содержащей либо 100 ед. акт. *HaeIII*, либо 16 ед. акт. *BlsI*, либо 16 ед. акт. *GlaI*, в реакционном буфере, рекомендованном производителем, при температуре 37 °С (для *HaeIII*) или 30 °С (для *BlsI* и *GlaI*) в течение 2 ч. После инкубации ферменты инактивировались путем прогрева (80 °С для *HaeIII*, 65 °С — в случае *BlsI* и *GlaI*) в течение 20 мин. 1 мкл реакционной смеси, содержащей 5 нг ДНК, использовали в ПЦР.

**Полимеразная цепная реакция.** Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси в приборе «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) с использованием набора для GC-ПЦР, HotStart *Taq* ДНК-полимеразы и праймеров, указанных в таблице 1 (все препараты производства компании «СибЭнзим»). Детальные условия проведения ПЦР указаны в таблице 2.

ПЦР-продукты разделялись путем электрофореза в 1,2% агарозе «Low EEO, Type 1-A» («Sigma», США) в трис-ацетатном буфере (40 мМ Трис-ацетат, pH 8,0; 1 мМ ЭДТА). После проведения электрофореза ДНК визуализировали бромистым этидием и фотографировали в УФ-свете. Для оценки длин фрагментов использовали ДНК-маркер «100 bp» производства компании «СибЭнзим».

## Результаты

**Анализ метилирования ДНК.** В настоящей работе с помощью метода *GlaI*- и *BlsI*-ПЦР-анализа было исследовано метилирование CpG-островков, расположенных в регуляторных участках нескольких генов-онкосупрессоров (*CEBPD*, *RASSF1A*, *SEPT9b*, *MGMT* и *IGFBP3A*). Расположение этих участков в человеческом геноме представлено в таблице 3 согласно сборке GRCh37.p5 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/human/index.shtml>).

Таблица 1

**Структура праймеров, использованных в ПЦР**

Ген	Обозначение праймера	Структура
CEBPD	Cd1	5'-CCTGGAGTGCTGGCAGAGGGAGTGTC-3'
	Cr1	5'-GGGCCGGGCTCTGCGTCCAA-3'
MGMT	Md1	5'-GGCGTGCCGGCGTCCAGCG-3'
	Mr1	5'-GGAGCGAGGCGACCCAGACACTCACC-3'
IGFBP3	Id1	5'-GCAGGTGCCCCGGGCGAGTCTCGA-3'
	Ir1	5'-CTCCCCGACGCGCACCCAGCA-3'
RASSF1A	Rd1	5'-CCGGATGTGGGGACCCTCTTCCTCTAGC-3'
	Rd2	5'-GCCATGTCCGGGGGAGCCTGAGCTCA-3'
	Rr1	5'-CTGTGGCCCAGATACGAGTGGAGTGCGAC-3'
	Rr2	5'-GGCCACTACTCACGCGCGCACTGCA-3'
	Rr3	5'-GCTCAATGAGCTCAGGCTCCCCCGAC-3'
SEPT9b	Sd1	5'-CTGCCCAAATACAGCCTCCTGCAGAAGG-3'
	Sd2	5'-CGCCTTCCTCCCCCATTCATTCAGCTG-3'
	Sd3	5'-CGACCCGCTGCCCACCAGCCATC-3'
	Sr1	5'-CCCTAGGCCCCCTGGCTCAGCTG-3'
	Sr2	5'-CGTTGACCGCGGGTCCGACATG-3'
	Sr3	5'-CGAGGAGGTCGCTGTTCGCTTGCCA-3'

Таблица 2

**Условия проведения ПЦР**

Ген	Длина фрагмента ПЦР	Первичная денатурация		Амплификация						Заключительная стадия		
				Число циклов	1. Денатурация		2. Отжиг		3. Полимеризация			
		t°	Время		t°	Время	t°	Время	t°	Время	t°	Время
CEBPD	341 bp	95 °C	2 мин.	38	96 °C	15 сек.	67 °C	20 сек.	72 °C	25 сек.	72 °C	1 мин.
MGMT	356 bp	95 °C	5 мин.	38	96 °C	15 сек.	71 °C	20 сек.	72 °C	25 сек.	72 °C	1 мин.
IGFBP3	817 bp	95 °C	5 мин.	38	95 °C	20 сек.	70 °C	20 сек.	72 °C	50 сек.	72 °C	1 мин.
RASSF1A	804 bp	95 °C	2 мин.	38	95 °C	20 сек.	68 °C	20 сек.	72 °C	50 сек.	72 °C	1 мин.
	385 bp	95 °C	2 мин.	38	95 °C	20 сек.	69 °C	20 сек.	72 °C	25 сек.	72 °C	1 мин.
	266 bp	95 °C	2 мин.	38	95 °C	15 сек.	71 °C	20 сек.	72 °C	20 сек.	72 °C	1 мин.
SEPT9b	432 bp	95 °C	3 мин.	38	96 °C	15 сек.	69 °C	20 сек.	72 °C	30 сек.	72 °C	1 мин.
	197 bp	95 °C	3 мин.	38	96 °C	15 сек.	70 °C	20 сек.	72 °C	20 сек.	72 °C	1 мин.
	399 bp	95 °C	2 мин.	38	96 °C	15 сек.	71 °C	20 сек.	72 °C	30 сек.	72 °C	1 мин.

**Расположение изучаемых областей генов-онкосупрессоров в геноме человека  
(в соответствии со сборкой GRCh37.p5)**

Регуляторная область гена	Хромосома	Локализация	Расположение исследованных фрагментов	Число сайтов для	
				GlaI	BlsI *
CEBPD	8	8p11.2-p11.1	515 093 – 515 433	11	1
MGMT	10	10q26	2 499161 – 2 499 516	16	0
IGFBP3	7	7p13-p12	45 951 065 – 45 950 249	41	1
RASSF1A	3	3p21.3	50 318 593 – 50 317 790	26	1
SEPT9b	17	17q25	40 643 169 – 40 644 107	33	3

Примечание: \* Принимались во внимание только сайты RCGCNGCGY

Структура регуляторных областей всех изучаемых генов-онкосупрессоров приведена на рисунке 1. Как показано на этом рисунке и в таблице 3, число сайтов 5'-RCGY-3' и 5'-RCGCNGCGY-3' в выбранных фрагментах ДНК существенно различается. Нами проводилось определение метилированных сайтов 5'-RMGY-3' и 5'-RMGCNGMGY-3' в регуляторных областях генов-онкосупрессоров в препаратах ДНК из пяти клеточных линий; четыре из них — это известные культуры малигнанных клеток (HeLa, Jurkat, Raji и U-937), а пятая — линия фибробластов L-68, использовавшаяся в качестве контроля. До проведения анализа все препараты геномной ДНК обрабатывались эндонуклеазой рестрикции, которая не содержит сайтов узнавания в выбранных фрагментах (Ttu9I в случаях SEPT9b и IGFBP3, TaqI для остальных случаев), в соответствии с процедурой предобработки ДНК, применяемой для бисульфитного анализа генома (Clark S.J. et al., 1994) [9].

Все препараты ДНК из клеточных линий по отдельности обрабатывались:

- 1) ферментом рестрикции, сайты которого имеются в изучаемой области ДНК (HaeIII) — положительный контроль;
- 2) GlaI (узнает 5'-RMGY-3', Tarasova G.V. et al., 2008 [29]);
- 3) BlsI (узнает 5'-RMGCNGMGY-3', <http://russia.sibenzyme.com/info800.php>);
- 4) в качестве отрицательного контроля использовались препараты, не обработанные ферментами.

После инкубации ДНК в четырех реакционных смесях служила матрицей для проведения ПЦР. Анализ ПЦР-продуктов осуществляли с применением электрофореза, а не с помощью ПЦР в реальном времени, ввиду относительно больших длин части получаемых фрагментов

ДНК (два фрагмента с длинами более 800 п.н.). ДНК из *Drosophila melanogaster* в той же концентрации использовалась в качестве отрицательного контроля ПЦР. На рисунке 2 показаны результаты GlaI- и BlsI-ПЦР-анализа пяти регуляторных участков.

**CEBPD.** На рисунке 2а представлены данные GlaI- и BlsI-ПЦР-анализа промоторной области гена CEBPD. Как видно из этого рисунка, продукт ПЦР длиной 341 п.н. присутствует в положительном контроле (дорожки 5, 9, 13, 19 и 23) и отсутствует при гидролизе ДНК из клеток Raji и U-937 ферментами GlaI и BlsI (дорожки 11, 12, 17 и 18). В изучаемом фрагменте ДНК находится всего одна последовательность 5'-RCGCNGCGY-3', которая в случае метилирования может расщепляться ферментом BlsI (5'-GCGCAGCGC-3', рис. 1а). Согласно результатам BlsI-ПЦР-анализа, данная последовательность остается неметилированной в ДНК L-68, HeLa и Jurkat и превращается в полностью метилированную последовательность 5'-GMGCAGMGC-3'/3'-CGMGTCGMG-5' в клетках Raji и U-937.

Таким образом, согласно данным GlaI- и BlsI-ПЦР-анализа, как минимум два метилированных сайта 5'-RMGY-3' присутствуют в CpG-островке в промоторной области гена CEBPD в ДНК из Raji и U-937, тогда как в препаратах ДНК из контрольной линии L-68 и малигнанных линий HeLa и Jurkat изучаемый фрагмент ДНК длиной 341 п.н. не содержит метилированных сайтов 5'-RMGY-3'. Полученные данные свидетельствуют об активности гена CEBPD в клетках контрольной линии L-68 и малигнанных линий HeLa и Jurkat, в то время как в клетках Raji и U-937 этот ген, по-видимому, не активен из-за наличия метилированных сайтов 5'-RMGY-3' в промоторной области.

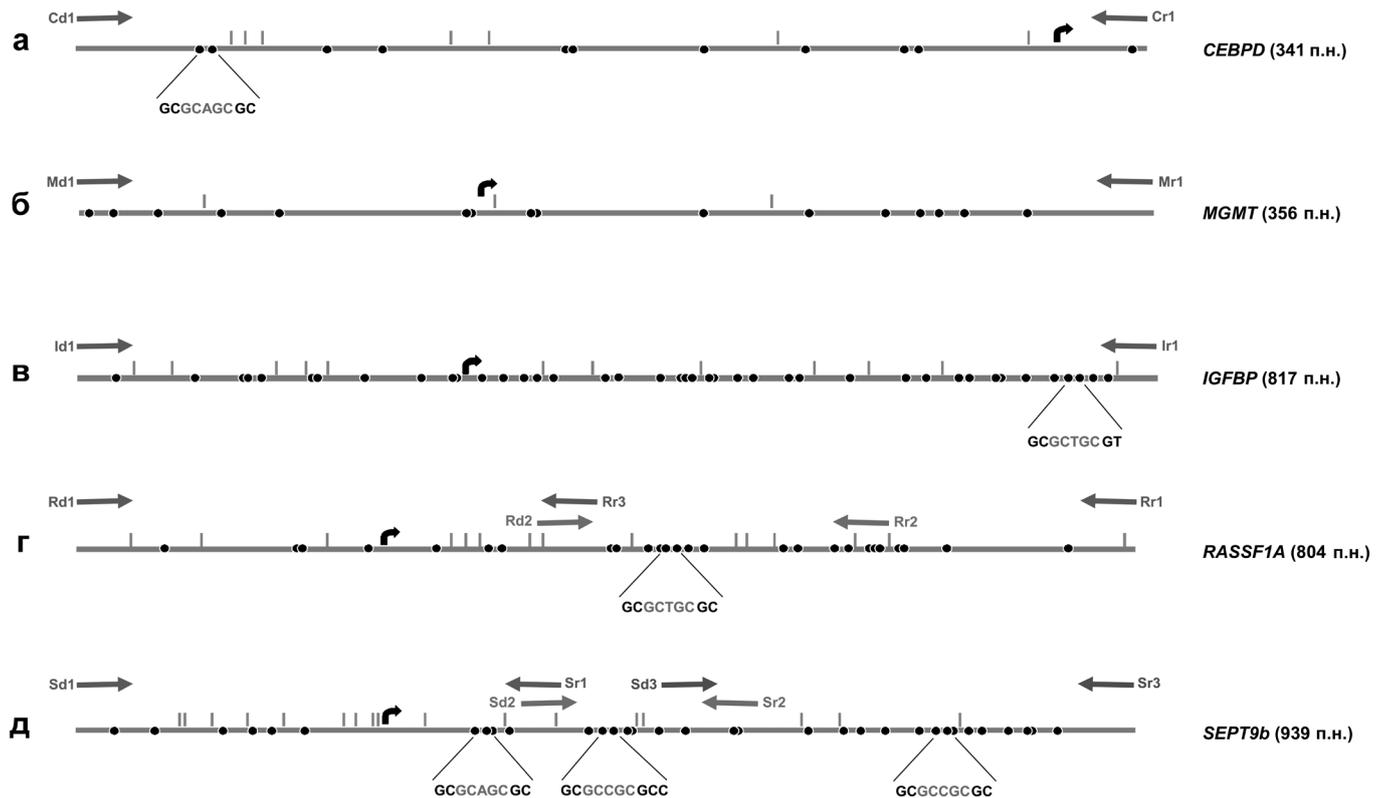


Рис. 1. Схемы регуляторных областей генов *CEBPB*, *RASSF1A*, *SEPT9b*, *MGMT* и *IGFBP3*. Сайты узнавания эндонуклеазы рестрикции *NaeIII* обозначены вертикальными черточками. Сайты 5'-RCGY-3' обозначены кружочками. Сайты 5'-RCGCNGCGY-3' вынесены ниже. Старт транскрипции обозначен изогнутой стрелкой. Размер фрагмента ДНК указан справа от каждой схемы. Расположение праймеров отмечено стрелками

Как сообщалось ранее, отсутствие белка *CEBPB* в клетках вызывает геномную нестабильность, включая перестройки хромосом, с последующей потерей контроля над клеточным ростом (Huang A.M. et al., 2004) [16]. Интересно, что такие хромосомные перестройки описаны как для клеток *Raji* (Karova M.B. et al., 2005) [19], так и для клеток *U-937* (Strefford J.C. et al., 2001) [28]. Следовательно, наши результаты подтверждают предполагаемую связь между выключением гена *CEBPB* и некоторыми разновидностями лейкемии.

**MGMT.** Рисунок 2б демонстрирует результаты *GlaI*- и *BlsI*-ПЦР-анализа области промотор/первый экзон гена-онкосупрессора *MGMT*. Продукт ПЦР длиной 356 п.н. образуется во всех случаях *GlaI*-ПЦР-анализа, за исключением препарата ДНК из клеток *U-937* (рис. 2б, дорожка 17). Поэтому можно заключить, что CpG-островки в области промотор/первый экзон гена *MGMT* имеет как минимум один сайт 5'-RMGY-3' в клетках *U-937*, тогда как в остальных малигнанных клеточных линиях и контрольных клетках *L-68* этот фрагмент ДНК не содержит сайтов 5'-RMGY-3'. *BlsI*-ПЦР-анализ дает отрицательный результат для препаратов

ДНК из всех клеточных линий, что, вероятно, связано с отсутствием сайтов 5'-RCGCNGCGY-3' в изучаемом участке ДНК (рис. 16).

Экспрессия гена *MGMT* ранее изучалась в *U-937*, *Jurkat*, *Raji* и некоторых других клеточных линиях. Активность гена не была выявлена в клетках *U-937*, однако довольно высокая активность этого гена была обнаружена в клетках *Jurkat* и *Raji* (Horton T.M. et al., 2009) [15]. Полученные нами результаты соответствуют этим данным литературы.

**IGFBP3.** На рисунке 2в представлены результаты *GlaI*- и *BlsI*-ПЦР-анализа регуляторной области гена *IGFBP3*. Фрагмент ДНК рассчитанной длины (817 п.н.) образуется при амплификации ДНК из контрольной линии клеток *L-68* и малигнанных клеток *HeLa* при гидролизе ДНК как *GlaI*, так и *BlsI* (дорожки 3–4 и 7–8), в то время как этот фрагмент не наблюдается при ПЦР-анализе препаратов ДНК из других малигнанных клеточных линий.

В анализируемом фрагменте ДНК длиной 817 п.н. присутствует всего одна последовательность 5'-RCGCNGCGY-3', которая в случае метили-

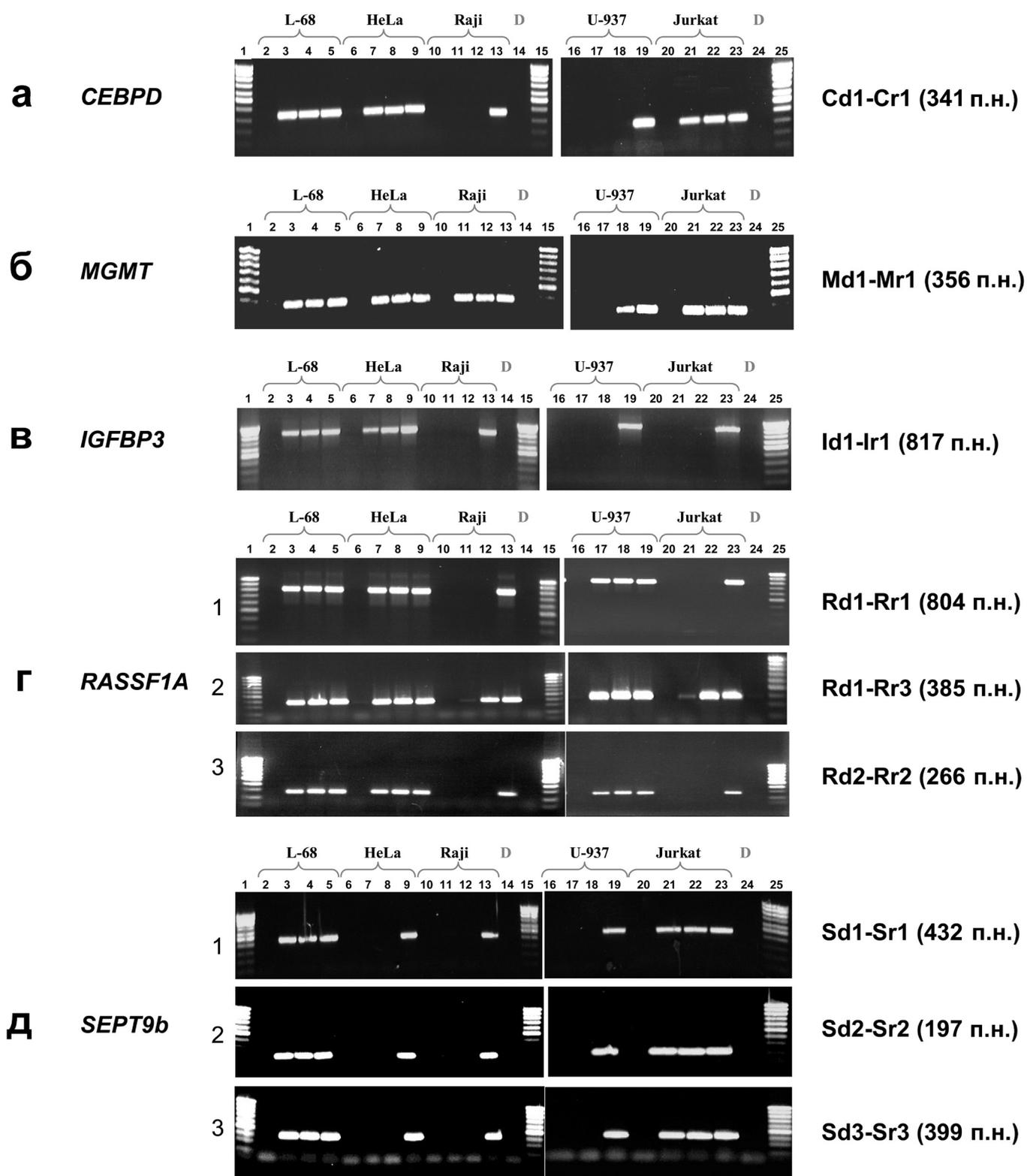


Рис. 2. *BlsI*- и *GluI*-ПЦР-анализ выбранных областей. Предобработанная ДНК из L-68 (2–5), HeLa (6–9), Raji (10–13), U-937 (16–19), Jurkat (20–23); ДНК из *Drosophila melanogaster* (14 и 24); *HaeIII* (2, 6, 10, 16, 20); *GluI* (3, 7, 11, 17, 21); *BlsI* (4, 8, 12, 18, 22); без добавления фермента (5, 9, 13, 19, 23); ДНК маркер «100 бр» (1, 15, 25). Обозначения праймеров для ПЦР (см. рис. 1) и длины областей показаны справа

рования может расщепляться ферментом BslI (5'-GCCGTGCCG-3', рис. 1в). В соответствии с полученными результатами последовательность 5'-GCCGTGCCG-3' остается неметилированной только в ДНК L-68 и HeLa и превращается в метилированную последовательность 5'-GMGCTGMGT-3'/3'-CGMGACGMA-5' в клетках Jurkat, Raji и U-937. Таким образом, согласно данным Glal- и BslI-ПЦР-анализа, как минимум два метилированных сайта 5'-RMGY-3' присутствуют в регуляторной области гена IGFBP3 в ДНК из клеточных линий Jurkat, Raji и U-937, тогда как в препаратах ДНК из контрольной линии L-68 и малигнанных линий HeLa исследуемая область промотора и первого экзона не содержит метилированных сайтов 5'-RMGY-3'.

Ранее было найдено, что уровень белка IGFBP3 в раковых клетках может уменьшаться во время развития некоторых онкологических заболеваний, включая рак простаты (Miyake H. et al., 2000) [23], эндометриоидную карциному яичника (Torng P.L. et al., 2009) [30] и рак прямой кишки (Kawasaki T. et al., 2007) [20]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что метилирование регуляторной области гена IGFBP3 и, вероятно, последующее падение уровня соответствующего белка происходят и в случае лейкоэмических заболеваний, хотя инактивация данного гена не наблюдается в клетках рака шейки матки линии HeLa.

**RASSF1A.** Нами раньше был проведен Glal- и BslI-ПЦР-анализ ДНК фрагмента длиной 804 п.н., содержащего CpG-островок регуляторной области гена RASSF1A, и было показано, что он содержит сайты 5'-RMGY-3' только в клетках Raji и Jurkat [1]. На рисунке 2г представлены результаты более детального анализа распределения метилированных сайтов 5'-RMGY-3' в этом фрагменте ДНК. Помимо целого фрагмента 804 п.н., нами были отдельно проанализированы промоторная область гена RASSF1A (фрагмент ДНК длиной 385 п.н.) и часть первого экзона (фрагмент ДНК длиной 266 п.н.) с расположенной внутри него последовательностью 5'-GCCGTGCCG-3' (рис. 1г). На рисунке 2г приведены результаты Glal- и BslI-ПЦР-анализа трех указанных фрагментов ДНК. ПЦР продукт расчетной длины наблюдается при анализе всех трех фрагментов в случае препаратов ДНК из контрольной линии клеток, а также ДНК из клеток HeLa и U-937 cells (дорожки 3–4, 7–8, 17–18 на рисунке 2г). Не наблюдается целевого ПЦР продукта при амплификации фрагментов 804 п.н. и 266 п.н. при анализе ДНК из клеток Raji и Jurkat (ряды 1 и 3, дорожки 11–12, 21–22), что

объясняется метилированием вышеуказанной последовательности 5'-GCCGTGCCG-3' с образованием сайта 5'-GMGCTGMGT-3'/3'-CGMGACGMA-5', расщепляемого ферментом BslI [1].

Не такая однозначная картина наблюдается в случае Glal-ПЦР-анализа фрагмента длиной 385 п.н. На данном фрагменте BslI-ПЦР-анализ дает отрицательный результат при исследовании всех препаратов ДНК (ряд 2, дорожки 4, 8, 12, 18, 22), что, вероятно, связано с отсутствием внутри него сайтов 5'-RCGCNGCGY-3'. В то же время Glal-ПЦР-анализ показал наличие метилированных сайтов 5'-RMGY-3' в изучаемом фрагменте только в клетках Raji и Jurkat (ряд 2, дорожки 11 и 21), что соответствует данным, полученным при анализе фрагментов 804 п.н. и 266 п.н. Однако следует отметить, что если фрагменты 804 п.н. и 266 п.н. отсутствуют при Glal-ПЦР-анализе ДНК из клеток Raji и Jurkat (ряды 1 и 3, дорожки 11 и 21), то в случае фрагмента 385 п.н. ПЦР продукт все-таки образуется, хотя и в меньшей степени, чем в контроле (дорожки 13 и 23).

Изучение метилирования области промотор / первый экзон гена RASSF1A проводилось также в работах других авторов [10, 14, 25]. Кроме того, осуществлялось и детальное исследование этого участка в клетках рака молочной железы (Yan P.S. et al., 2003) [31]. В ряде клеточных линий авторы выявили значительную степень метилирования первого экзона на участке, содержащем сайт 5'-GCCGTGCCG-3', и менее выраженное метилирование области промотора, что соответствует нашим данным.

**SEPT9b.** Регуляторный участок гена SEPT9b включает в себя три сайта 5'-GCCGNGCGC-3', расположенные после старта транскрипции (рис. 1д) и расщепляемые BslI в случае их метилирования. Мы проводили Glal- и BslI-ПЦР-анализ отдельно для трех участков ДНК, каждый из которых содержал один сайт 5'-GCCGNGCGC-3', определяя таким образом статус метилирования трех соседних перекрывающихся между собой фрагментов на всей области промотор/первый экзон (432, 197 и 399 п.н.). Данные, приведенные на рисунке 2д, показывают, что все три фрагмента метилированы одинаково для каждой из клеточных линий. Амплифицированные фрагменты ДНК с рассчитанными длинами наблюдаются только в случаях контрольных клеток фибробластов и клеток линии Jurkat (рис. 2д, ряды 1–3, дорожки 3–4 и 21–22). Полученные результаты свидетельствуют, что сайт 5'-GMGCNGMGC-3' присутствует в каждом анализируемом участке в ДНК из клеток HeLa, Raji и U-937, тогда как эти последователь-

ности не метилированы во всей регуляторной области в клетках L-68 и Jurkat.

Аберрантное метилирование регуляторной области гена SEPT9b в опухолевых клетках было описано у больных раком прямой кишки (Gruetzmann R. et al., 2008) [12]. Результаты нашего исследования показывают, что аномальное метилирование по сайтам 5'-GMGCNGMGC-3' также обнаруживается и в других малигнанных клетках.

### Обсуждение

**Определение статуса метилирования регуляторных областей генов-онкосупрессоров методом Glal- и BlsI-ПЦР-анализа.** Метилирование ДНК в регуляторных областях генов-онкосупрессоров является основной причиной их инактивации (Jones P.A. and Baylin S.B., 2002) [18] и наблюдается на ранних стадиях развития канцерогенеза (de Cáseres I.I. et al., 2007) [8]. В связи с этим определение статуса метилирования этих участков ДНК является важной задачей при ранней диагностике онкопатологии. В последнее время для выявления метилированных оснований применяется метод бисульфитной конверсии ДНК, который позволяет проводить прямое определение 5-метилцитозинов в интересующем участке ДНК (Grigg G.W., 1996) [11]; однако этот метод имеет ряд недостатков и в повседневной клинической практике фактически не используется. В настоящей работе разработанный нами метод Glal- и BlsI-ПЦР-анализа [1] был применен для определения сайтов 5'-RMGY-3' и 5'-RMGCNGMGY-3' в регуляторных областях генов-онкосупрессоров SEBPD, RASSF1A, SEPT9b, MGMT и IGFBP3. Результаты, полученные методом Glal- и BlsI-ПЦР-анализа, показали хорошее соответствие с данными литературы по анализу регуляторных участков генов-онкосупрессоров методом бисульфитной конверсии ДНК. При этом метод Glal- и BlsI-ПЦР-анализа является простым в исполнении и в большинстве случаев дает однозначный результат (есть метилированные сайты 5'-RMGY-3' или нет), а в случае BlsI-ПЦР-анализа полученный результат был однозначным во всех экспериментах. BlsI-ПЦР-анализ продемонстрировал либо наличие сайтов 5'-RMGCNGMGY-3' в изучаемом фрагменте во всех анализируемых молекулах ДНК той или иной клеточной линии, либо их полное отсутствие. Это позволяет рассматривать Glal- и BlsI-ПЦР-анализ как простой и однозначный метод определения статуса метилирования регуляторных областей генов-онкосупрессоров.

**Распределение сайтов 5'-RMGY-3' в регуляторных участках.** Ранее мы использовали Glal-ПЦР-анализ для определения метилирования ДНК в регуляторном участке гена RARB в малигнанных линиях клеток HeLa, Jurkat, Raji, U-937 и контрольной линии клеток L-68 [1]. При этом было выявлено наличие сайта 5'-RMGY-3' во всех опухолевых клетках и отсутствие такового в клетках фибробластов. BlsI-ПЦР-анализ регуляторной области гена DAPK1 показал, что метилированная последовательность 5'-GMGCCGMGC-3'/3'-CGMGGCGMG-5' присутствует только в ДНК клеток Raji [1].

Результаты, полученные в настоящем исследовании, вместе с данными, опубликованными ранее [1], представлены в таблице 4.

Эта таблица включает в себя результаты определения статуса метилирования регуляторных участков генов-онкосупрессоров RARB, DAPK1, SEBPD, RASSF1A, SEPT9b, MGMT и IGFBP3 методом Glal- и BlsI-ПЦР-анализа. Как видно из таблицы 4, Glal- и BlsI-ПЦР-анализ выявил различные комбинации регуляторных участков генов-онкосупрессоров с метилированными сайтами 5'-RMGY-3' во всех пяти клеточных линиях человека.

BlsI-ПЦР-анализ дает отрицательный результат при изучении генов RARB и MGMT, вероятно, ввиду отсутствия сайтов 5'-RCGCNGCGY-3' в регуляторных областях этих генов, тогда как Glal-ПЦР-анализ позволяет установить различие в статусе метилирования данных участков ДНК в изучаемых клеточных линиях. Если в случае гена RARB сайты 5'-RMGY-3' присутствуют в регуляторной области в ДНК всех изученных малигнанных линий, но не клеток контрольной линии фибробластов, то CpG-островок гена MGMT содержит данный сайт только в клетках U-937 (см. табл. 4).

С помощью Glal-ПЦР-анализа и BlsI-ПЦР-анализа были получены одинаковые результаты при изучении метилирования регуляторных областей генов-онкосупрессоров SEBPD, IGFBP3, SEPT9b и RASSF1A, за исключением промоторной области последнего. Однако при этом препараты ДНК из всех изученных клеточных линий различаются по комбинациям метилированных генов: промотор гена SEBPD метилирован лишь в клетках Raji и U-937; промотор и первый экзон гена RASSF1A метилированы только в клетках Raji и Jurkat; промотор и первый экзон гена SEPT9b метилирован в клетках U-937, Raji и HeLa; промотор и первый экзон гена IGFBP3 метилирован в клетках U-937, Raji и Jurkat.

Объединенные данные результатов BslI- и GlalI- ПЦР-анализа

Метод		GlalI-ПЦР-анализ		BslI-/GlalI-ПЦР-анализ				BslI-ПЦР-анализ
Клеточная линия	Ген	RARB	MGMT	CEBPB	IGFBP3	RASSF1A	SEPT9b	DAPK1
L-68 фибробласты легкого		-	-	-	-	-	-	-
HeLa аденокарцинома шейки матки		+	-	-	-	-	+	-
Raji лимфома Беркитта		+	-	+	+	+	+	+
U-937 гистиоцитарная лимфома		+	+	+	+	-	+	-
Jurkat Т-лимфобластная лейкемия		+	-	-	+	+	-	-

GlalI-ПЦР-анализ промоторной области гена RASSF1A в ДНК из клеток Raji и Jurkat показал, что в отличие от фрагментов 804 и 266 нуклеотидов, содержащих сайт 5'-RMGY-3' во всех молекулах анализируемых ДНК, последовательность 5'-RMGY-3' присутствует во фрагменте 385 п.н. лишь в части молекул ДНК данных клеток. Можно предположить, что в клетках Raji и Jurkat промоторная область гена RASSF1A содержит сайт 5'-RMGY-3' только в одной аллели генома, тогда как в первом экзоне данного гена последовательность 5'-GMGCTGMGC-3' с двумя сайтами 5'-RMGY-3' присутствуют в обеих аллелях хромосомного набора клеток. Дальнейшая работа по GlalI-ПЦР-анализу данной области ДНК в режиме реального времени даст возможность проверить сделанное предположение.

**Анализ структуры ДНК в области сайтов узнавания BslI.** При BslI-ПЦР-анализе регуляторных участков генов-онкосупрессоров было найдено, что каждый из семи сайтов 5'-RCCGNGCGY-3' (с учетом ранее исследованного регуляторного участка гена DAPK), присутствующих в изучаемых фрагментах ДНК (см. рис. 1 и работу [1]), метилирован, по крайней мере, в одной малигнантной клеточной линии. В случаях CpG-островков генов IGFBP3 и SEPT9b эти сайты метилированы в трех разных клеточных линиях (за исключением линий HeLa и Jurkat, соответственно). В регуляторных областях генов CEBPD и RASSF1A эти

последовательности метилированы в двух различающихся клеточных линиях (Raji, U-937 и Raji, Jurkat, соответственно). Сайт 5'-GCGCCGCGC-3' в CpG-островке гена DAPK1 метилирован только в клетках Raji. Таким образом, сайты 5'-RCCGNGCGY-3' в регуляторных областях генов-онкосупрессоров метилированы в различных комбинациях в зависимости от клеточной линии, из которой выделялась ДНК, однако каждый из сайтов метилирован в ДНК хотя бы в одной клеточной линии. На рисунке 3 представлена нуклеотидная последовательность семи фрагментов ДНК, которые содержат сайты 5'-RCCGNGCGY-3'. Сравнительный анализ структуры ДНК не выявил какого-либо сходства окрестностей сайтов у всех фрагментов. Тем не менее следует отметить, что каждый из фрагментов содержит прямые повторы, окружающие сайты 5'-RCCGNGCGY-3'. Эти повторы имеют длину 5–6 п.н. и располагаются на разных расстояниях от сайта 5'-RCCGNGCGY-3'. При этом они состоят преимущественно из G и C нуклеотидов.

**Типирование малигнантных клеточных линий.** Присутствие метилированных сайтов 5'-RMCNGMGY-3' в исследованных регуляторных участках генов DAPK1, CEBPD, IGFBP3, RASSF1A и SEPT9b, отличающееся для изученных малигнантных клеточных линий, позволяет предложить простой способ типирования опухолевых клеточных линий на основе результатов GlalI- и/или BslI-ПЦР-анализа указанных участков ДНК.

	1	50
<b>DAPK1</b>	<b>GGAGCTGGGAGGAGCAGCGAGCGCCGCGCAGAACCCGCAGCGCCGGCCTGGC</b>	
<b>SEPT9b-2</b>	<b>TCTGCACTGCAGGAGCGCGGGCGCGGCCCCAGCCAGCGCGCAGGGCCCGG</b>	
<b>IGFBP3</b>	<b>GTGAGCCGCCCGCGCCAGGTGCGCTGCGTGCAGCACCCGGCGCACTGGCGCC</b>	
<b>SEPT9b-1</b>	<b>GAGGCGGGGGCGGGGCGGGGCGCAGCGCGCGGGGAGGGGCGGGCGCCCGCC</b>	
<b>RASSF1A</b>	<b>CCCGGCTGGAGCGTGCCAACGCGCTGCGCATCGCGCGGGGCACCGCGTGCAA</b>	
<b>SEPT9b-3</b>	<b>CAGGCGCCCTCCCGCTGAGAGCGCCGCGCGCCCGGGCCCGGTGCCCGCGCC</b>	
<b>CEBPB</b>	<b>AGGGAGTGTTCATTCCAGCAGCGCAGCGCAGGCCGGCCCGGGCCGGGGAGGG</b>	

Рис. 3. Структура ДНК в регуляторной области генов-онкосупрессоров в районе последовательности 5'-RCGCNGCGY-3'. Серым фоном выделены сайты метилирования, формирующие сайт 5'-RCGCNGCGY-3'.

Прямые повторы ДНК выделены подчеркиванием

Важно отметить, что результатом такого *GlaI*- и / или *BlsI*-ПЦР-анализа является либо наличие, либо отсутствие ПЦР продукта, что дает возможность достаточно просто получать и интерпретировать результаты анализа.

Аутентификация клеточных линий — это очень важная проблема современной биологии. Хорошо известно, что многие из клеточных линий, поддерживаемых в лабораториях, неправильно идентифицированы или загрязнены [7, 24, 27]. Для аутентификации клеточных линий используется большое число методов, таких как изоферментный анализ, кариотипирование, однонуклеотидный полиморфизм (SNP), полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (AFLP). Недавно в качестве стандарта характеристики и определения клеточных линий, а также для подтверждения чистоты культур клеток был предложен метод профилирования коротких tandemных повторов (STR) [3, 5]. Для использования цитологических и биохимических методов идентификации (морфологические наблюдения, кариотипирование и изоферментный анализ) требуются серьезные различия в свойствах и внешнем виде клеток. Эти методы обычно недостаточно надежны и не пригодны в качестве обычных лабораторных процедур. Современные молекулярные подходы, основанные на вариабельности ДНК, более точны, и прогресс в стандартизации некоторых из них может иметь большое значение для клеточной биологии и онкологии.

Однако ни один из перечисленных методов не учитывает эпигенетический аспект при идентификации клеточных линий, который особенно важен для клеточных линий, выделенных из раковых опухолей. Известно, что статус метилирования определенных участков ДНК является существенным признаком малигнантиности, при этом различия в метилировании CpG-островков наблюдаются у многих из малигнанных

клеточных линий (Issa J.-P., 2004) [17]. Таким образом, определение статуса метилирования регуляторных областей генов-онкосупрессоров представляется ключевым критерием при определении и дифференциации малигнанных клеточных линий. В настоящей работе показано, что комбинация статусов метилирования семи регуляторных участков генов-онкосупрессоров различается в каждой из анализируемых малигнанных клеточных линий (см. табл. 4). То есть, *BlsI*-ПЦР-анализ регуляторных областей ДНК может быть использован для быстрой эпигенетической характеристики малигнанных клеточных линий.

### Заключение

*GlaI*- и *BlsI*-ПЦР-анализ был применен для определения статуса метилирования регуляторных участках генов-онкосупрессоров человека *SEPT9b*, *IGFBP3*, *CEBPB*, *MGMT* и *RASSF1A*. Статус метилирования регуляторных участков генов-онкосупрессоров определялся по наличию в них метилированных сайтов 5'-RMGY-3'. Каждая из исследованных малигнанных клеточных линий (HeLa, Raji, U-937 и Jurkat) отличается от других по комбинации регуляторных участков, содержащих метилированные сайты 5'-RMGY-3'. ДНК из клеток контрольной линии фибробластов L-68 не содержит сайтов 5'-RMGY-3' ни в одной из упомянутых регуляторных областей.

*GlaI*- и *BlsI*-ПЦР-анализ:

а) промоторной области гена *CEBPB* установил наличие метилированных сайтов 5'-RMGY-3' в ДНК в клетках Raji и U-937;

б) области промотор / первый экзон гена *RASSF1A* показал метилирование ДНК в клетках Raji и Jurkat;

в) области промотор / первый экзон гена SEPT9b выявил метилирование ДНК в клетках U-937, Raji и HeLa;

г) области промотор / первый экзон гена IGFBP3 продемонстрировал метилирование ДНК в клетках U-937, Raji и Jurkat.

GlaI-ПЦР-анализ области промотор / первый экзон гена MGMT выявил метилирование ДНК только в клетках U-937.

Эти результаты позволяют определять статус метилирования регуляторных участков генов-онкосупрессоров методом GlaI- и BslI-ПЦР-анализа и рассматривать его результаты как специфическую характеристику малигнанных клеточных линий. Такая характеристика может оказаться полезной для определения малигнанных клеточных линий и дополнить другие методы типирования этих клеток.

## Литература

1. Гончар Д.А., Акишев А.Г., Дегтярев С.Х. BslI- и GlaI-ПЦР анализ — новый метод исследования метилированных участков ДНК // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова — 2010. — Т. 6. — № 1 — С. 5–12.
2. Киселева Н.П., Лихтенштейн А.В. Эпигенетические изменения в опухолевых клетках. Роль метилирования ДНК в канцерогенезе. Канцерогенез / Под ред. Д.Г. Заридзе. — М.: Медицина, 2004. — С. 191–203.
3. Alston-Roberts C., Barallon R., Bauer S.R., Butler J., Capes-Davis A. et al. Cell line misidentification: the beginning of the end // Nat. Rev. Cancer — 2010. — Vol. 10. — P. 441–448.
4. Antequera F. Structure, function and evolution of CpG island promoters // Cell. Mol. Life Sci. — 2003. — Vol. 60. — P. 1647–1658.
5. Barallon R., Bauer S.R., Butler J., Capes-Davis A., Dirks W.G. et al. Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues // In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. — 2010. — Vol. 46. — P. 727–732.
6. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory // Genes. Dev. — 2002. — Vol. 1. — P. 6–21.
7. Capes-Davis A., Theodosopoulos G., Atkin I., Drexler H.G., Kohara A. et al. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines // Int. J. Cancer. — 2010. — Vol. 127. — P. 1–8.
8. de Cáseres I.I., Cairns P. Methylated DNA sequences for early cancer detection, molecular classification and chemotherapy response prediction // Clin. Transl. Oncol. — 2007. — Vol. 9. — P. 429–437.
9. Clark S.J., Harrison J., Paul C.L., Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines // Nucleic Acids Res. — 1994. — Vol. 22. — P. 2990–2997.
10. Feng Q., Hawes S.E., Stern J.E., Wiens L., Lu H. et al. DNA methylation in tumor and matched normal tissues from non-small cell lung cancer patients // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. — 2008. — Vol. 17. — P. 645–654.
11. Grigg C.W. Sequencing 5-methylcytosine residues by the bisulphite method // DNA Seq. — 1996. — Vol. 6. — P. 189–198.
12. Gruetzmann R., Molnar B., Pilarsky C., Habermann J.K., Schlag P.M. et al. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay // PLoS One. — 2008. — Vol. 3(11). — e3759.
13. Handa V., Jeltsch A. Profound sequence preference of Dnmt3a and Dnmt3b mammalian DNA methyltransferases shape the human epigenome // J. Mol. Biol. — 2005. — Vol. 348. — P. 1103–1112.
14. Hesson L.B., Cooper W.N., Latif F. The role of RASSF1A methylation in cancer // Dis. Markers. — 2007. — Vol. 23. — P. 73–87.
15. Horton T.M., Jenkins G., Pati D., Zhang L., Dolan M.E. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor ABT-888 potentiates the cytotoxic activity of temozolomide in leukemia cells: influence of mismatch repair status and O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity // Mol. Cancer Ther. — 2009. — Vol. 8. — P. 2232–2242.
16. Huang A.M., Montagna C., Sharan S., Ni Y., Ried T., Sterneck E. Loss of CCAAT/enhancer binding protein delta promotes chromosomal instability // Oncogene. — 2004. — Vol. 23. — P. 1549–1557.
17. Issa J.-P. CpG island methylator phenotype in cancer // Nat. Rev. Cancer. — 2004. — Vol. 4. — P. 988–993.
18. Jones P.A., Baylin S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer // Nat. Rev. Genet. — 2002. — Vol. 3. — P. 415–428.
19. Karpova M.B., Schoumans J., Ernberg I., Henter J.-I., Nordenskjöld M., Fadeel B. Raji revisited: cytogenetics of the original Burkitt's lymphoma cell line // Leukemia. — 2005. — Vol. 19. — P. 159–161.
20. Kawasaki T., Noshio K., Ohnishi M., Suemoto Y., Kirkner G.J., Fuchs C.S., Ogino S. IGFBP3 promoter methylation in colorectal cancer: relationship with microsatellite instability, CG island methylator phenotype, and p53 // Neoplasia. — 2007. — Vol. 9. — P. 1091–1098.
21. Kim S., Li M., Paik H., Nephew K., Shi H., Kramer R., Xu D., Huang T.-H. Predicting DNA methylation susceptibility using CpG flanking sequences // Pac. Symp. Biocomput. — 2008. — Vol. 13. — P. 315–326.
22. Mishra D.K., Chen Z., Wu Y, Sarkissyan M., Koeffler H.P., Vadgama J.V. Global methylation pattern of genes in androgen-sensitive and androgen-independent prostate cancer cells // Mol. Cancer Ther. — 2010. — Vol. 9. — P. 33–45.

23. Miyake H., Pollak M., Gleave M.E. Castration-induced up-regulation of insulin-like growth factor binding protein-5 potentiates insulin-like growth factor-I activity and accelerates progression to androgen independence in prostate cancer models // *Cancer Res.* — 2000. — Vol. 60. — P. 3058–3064.
24. Nardone R.M. Eradication of cross-contaminated cell lines: a call for action // *Cell Biol. Toxicol.* — 2007. — Vol. 23. — P. 367–372.
25. Peters I., Rehmet K., Wilke N., Kuczyk M.A., Hennenlotter J., Eilers T., Machtens S., Jonas U., Serth J. RASSF1A promoter methylation and expression analysis in normal and neoplastic kidney indicates a role in early tumorigenesis // *Mol. Cancer.* — 2007. — Vol. 6(1). — P. 49.
26. Sambrook J., Russell D. *Molecular cloning: A laboratory manual* / 3<sup>rd</sup> ed. — NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2001.
27. Stacey G.N. Cell contamination leads to inaccurate data: we must take action now // *Nature.* — 2000. — Vol. 403. — P. 356.
28. Strefford J.C., Foot N.J., Chaplin T., Neat M.J., Oliver R.T.D., Young B.D., Jones L.K. The characterisation of the lymphoma cell line U937, using comparative genomic hybridisation and multi-plex FISH // *Cytogenet. Cell Genet.* — 2001. — Vol. 94. — P. 9–14.
29. Tarasova G.V., Nayakshina T.N., Degtyarev S.K. Substrate specificity of new methyl-directed DNA endonuclease Glal // *BMC Mol. Biol.* — 2008. — Vol. 9. — P. 7.
30. Torng P.L., Lin C.W., Chan M.W., Yang H.W., Huang S.C., Lin C.T. Promoter methylation of IGFBP-3 and p53 expression in ovarian endometrioid carcinoma // *Mol. Cancer.* — 2009. — Vol. 8. — P. 120.
31. Yan P.S., Shi H., Rahmatpanah F., Hsiau T.H., Hsiau A.H., Leu Y.W., Liu J.C., Huang T.H. Differential distribution of DNA methylation within the RASSF1A CpG island in breast cancer // *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63. — P. 6178–6186.

## EPIGENETIC TYPING OF HUMAN CANCER CELL LINES BY BslI- AND Glal-PCR ASSAYS

A.G. AKISHEV, D.A. GONCHAR, M.A. ABDURASHITOV, S.Kh. DEGTYAREV

*SibEnzyme, Novosibirsk, Russia*

BslI- and Glal-PCR assays have been applied to determine a methylation status of regulatory regions of SEPT9b, IGFBP3, CEBPD, MGMT and RASSF1A tumor suppressor genes in malignant cell lines HeLa, Raji, U-937, Jurkat and in the control fibroblast cell line L-68. Glal- and BslI-PCR assays have shown either presence or absence of 5'-RMGY-3' sites in the regulatory regions of the studied tumor suppressor genes depending on malignant cell line, which was a source of DNA preparation. Regulatory regions are methylated in different combinations in the studied malignant cell lines. At the same time no 5'-RMGY-3' sites have been found in these regulatory regions in DNA from normal fibroblast cell line L-68. These results show that method of BslI- and Glal-PCR assays allow to determine and to discriminate malignant cell lines. Thus, BslI- and Glal-PCR assays may be used for epigenetic typing of malignant cell lines.

*Keywords:* DNA methylation, methyl-dependent DNA endonucleases, BslI, Glal, epigenetics, malignant cell lines.

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПЕРЕРАБОТКИ ФИБРИНА – ОТХОДА ПРОИЗВОДСТВА ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА

И.М. ЖУЛИДОВ, Е.Г. АБРАМОВА, М.В. АНТОНЫЧЕВА, А.К. НИКИФОРОВ\*, И.В. ШУЛЬГИНА, О.А. ЛОБОВИКОВА, Н.И. ВАХРУШИНА, С.А. ЕРЕМИН, Т.В. АЛЕНКИНА

*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

Рассмотрены биотехнологические аспекты переработки и применения фибрина — одного из отходов производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина. Оптимизирована технология получения панкреатического гидролизата фибрина и изучены его физико-химические свойства в сравнении с гидролизатами традиционного сырья — казеина и мяса крупного рогатого скота. Подтверждена возможность использования гидролизата фибрина в качестве белковой основы питательных сред для культивирования микроорганизмов.

*Ключевые слова:* гетерологичный антирабический иммуноглобулин, отход производства, фибрин, гидролизат, питательная основа, питательная среда, физико-химический состав, ростовые свойства.

### Введение

В настоящее время в практике здравоохранения широко применяют медицинские иммунобиологические препараты (МИБП) — сыворотки, вакцины, иммуноглобулины, производство которых сопровождается образованием значительного количества белковых отходов. При изготовлении сыворотки побочными продуктами являются форменные элементы крови и фибрин, при получении иммуноглобулинов — белковые фракции крови (фибрин, альбумин,  $\alpha$ -,  $\beta$ -глобулины), в вакцинном производстве — культуральная жидкость. Отходы, образующиеся при производстве МИБП, в том числе биологические, перерабатываются в незначительной степени для использования в качестве кормовых добавок или утилизируются как отходы производства и вывозятся на полигон твердых бытовых отходов, что способствует ухудшению экологической обстановки [14, 21].

Утилизация и использование отходов производства МИБП — важнейшие составные элементы мало- и без-

отходных технологических процессов, имеющие большое значение для повышения экономической эффективности биотехнологической промышленности.

В 1980-х гг. с развитием эколого-экономического подхода к производству появились работы по поиску безотходных технологий. Были предложены различные способы использования «утильных» белков. Так, была разработана технология выделения белков — серопротеина и альбумина — из отходов глобулинового производства с помощью полиэтиленгликолевого метода для получения гидролизатов [8, 19]. Отходы вакцинно-сывороточного производства (туши животных) использовали для получения пептона, а гидролизаты лошадиных эритроцитов — в качестве основы питательной среды (ПС) для выращивания культур клеток и репродукции вирусов [16, 17]. Кузьмиченко И.А. с соавт. (2009) выделили ферментный комплекс из отхода производства холерной вакцины для проведения гидролиза белкового сырья [6]. Матвеевская Н.С. (1996) предложила упрощенный и удешевленный способ выделения С4 и С3 компонентов комплемента человека из отходов промышленного фракционирования плазмы крови по Кону [9, 10]. Кострова О.М. с соавт. (1995), используя отходы промышленного фракционирования человеческой плазмы, получили противогерпетический иммуноглобулин человека, состоящий на 97% из IgG [5]. Мац А.Н. с соавт. (1997) получили трансфер-факторный препарат «Аффинолейкин» из лейкоцитарной массы — не утилизируемого отхода производства альфа-интерферона человека [11].

© 2011 г. Жулидов И.М., Абрамова Е.Г., Антонычева М.В., Никифоров А.К., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Вахрушина Н.И., Еремин С.А., Аленкина Т.В.

\* **Автор для переписки:**

Никифоров Алексей Константинович

к.б.н., доцент, зам. директора по экспериментальной и производственной работе РосНИПЧИ «Микроб»

410005 Саратов, Университетская, 46

E-mail: akn7@yandex.ru

В производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина (АИГ) при получении сыворотки из иммунной плазмы крови лошадей побочным продуктом является фибриллярный белок. По суммарному содержанию аминокислот фибрин не уступает мясному сырью, его состав близок к белку мышечной ткани — миозину, что дает основание рассматривать его как полноценный продукт для изготовления ПС [17]. Применение фибрина для изготовления питательных основ и сред для культивирования микроорганизмов актуально в связи с поиском непищевых, экономичных видов сырья, альтернативных дорогостоящему традиционному мясу крупного рогатого скота (КРС), а также казеину, рыбе и т.д. [3, 7].

Цель настоящей работы — оптимизация биотехнологических этапов получения панкреатического гидролизата фибрина из отхода производства гетерологичного АИГ, характеристика его физико-химических свойств и определение возможности применения полученного гидролизата в качестве основы питательных сред для культивирования микроорганизмов.

### Материалы и методы

**Реактивы.** Кальций хлористый ( $\text{CaCl}_2$ , ч, ФСП 42-0006-5675-04), хлороформ ( $\text{CHCl}_3$ , чда, ТУ 2631-066-444-931-79-01), натрий безводный двууглекислый ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , чда, ГОСТ 4201-79), натрий хлористый ( $\text{NaCl}$ , хч, ГОСТ 4233-77), натрий фосфорнокислый двузамещенный ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , хч, ГОСТ 11773-76), активированный уголь (ГОСТ 4453-74).

**Условия гидролиза.** Фибрин образуется в качестве отхода на этапе дефибрикации иммунной плазмы крови лошадей. Плазму смешивали с 30% раствором хлористого кальция из расчета  $2,6 \text{ см}^3$  на  $1 \text{ дм}^3$  плазмы и выдерживали в течение 18 ч при температуре  $6 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Сгусток фибрина разрушали с помощью гомогенизатора (Bosch, Германия) и отделяли на сепараторе АСГ-3М при  $9000 \pm 200$  об./мин. Параллельно проводили предварительную подготовку поджелудочной железы (ПЖ) КРС (ГОСТ 112-85-93). ПЖ очищали от жировой и соединительной тканей и затем измельчали на мясорубке МИМ-600 УЗ (ТУ 899-111901-88). Для получения питательной основы фибрин подвергали гидролизу, используя свежеприготовленный фарш ПЖ КРС при рН  $8,0 \pm 0,2$ . Для лучшей денатурации белка предварительно проводили термическую обработку фарша фибрина при температуре  $100 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. в сосуде-реакторе.

Для проведения процесса гидролиза готовили смесь фибрина, ПЖ и воды в соотношении 4:1:4 в реакторе-ферментере объемом  $0,5 \text{ м}^3$ , оборудованном автоматической мешалкой. В качестве консерванта в смесь добавляли хлороформ до конечной концентрации  $2 \pm 0,2\%$ . Уровень рН регулировали добавлением натрия безводного двууглекислого. Гидролиз осуществляли при рН  $8,0 \pm 0,1$  и температуре  $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  до 10 сут. при периодическом перемешивании. В течение первых 5 ч смесь перемешивали через каждые 15 мин., затем — через каждые 8 ч. Процесс гидролиза контролировали ежедневно, ориентируясь на содержание аминного азота. Прекращение нарастания аминного азота свидетельствовало об окончании ферментативного процесса. Гидролизат отстаивали в течение суток, затем жидкую фазу декантировали и разливали в стеклянную посуду. В качестве консерванта добавляли хлороформ в количестве  $20 \text{ см}^3$  на  $1 \text{ дм}^3$  гидролизата. Хранение осуществляли в герметично закрытых бутылках (ГОСТ 14180-82) при температуре  $6 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  в течение 5–6 мес.

Гидролизат фибрина использовали в качестве основы при изготовлении плотных и жидких ПС для культивирования холерных вибрионов и чумного микроба в лабораторных условиях.

**Микроорганизмы и условия культивирования.** Для апробации биологических свойств ПС использовали полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» тест-штаммы *Vibrio cholerae* O1 P-1 (145), *Yersinia pestis* EV НИИЭГ и производственные штаммы *V. cholerae* O1 M-41, *V. cholerae* не O1 105. В качестве контрольных ПС использовали традиционно применяемые агар и бульон Хоттингера, имеющие соответственную для культивирования чумного и холерного вибриона реакцию рН  $7,3 \pm 0,1$  и  $7,9 \pm 0,1$ .

Выращивание холерных вибрионов в условиях глубинного культивирования проводили с принудительной аэрацией, перемешиванием и подкормкой 40%-ным раствором глюкозы в реакторе-ферментере 6У.

**Приготовление питательных сред.** На основе гидролизата фибрина также были изготовлены экспериментальные серии жидкой ПС для глубинного культивирования холерных вибрионов производственных штаммов *V. cholerae* O1 M-41, *V. cholerae* не O1 105.

Бульон готовили из расчета содержания в нем аминного азота  $0,2 \pm 0,01\%$ . Ферментативный перевар смешивали с активированным углем до концентрации  $1 \pm 0,1\%$ , кипятили 10 мин. при постоянном перемешивании и осветляли фильтрацией через фильтровальное полотно «Бельтинг». Далее в очищенную воду добавляли

хлористый натрий до конечной концентрации  $0,5 \pm 0,01\%$  и фосфорнокислый двузамещенный натрий до конечной концентрации  $0,06 \pm 0,001\%$ , в полученном растворе устанавливали значение рН  $8,0 \pm 0,2$ . Осветленный гидролизат и воду с растворенными в ней ингредиентами перемешивали и кипятили в течение 20 мин., поддерживая рН бульона на уровне  $8,0 \pm 0,2$ . Проводили осветляющую фильтрацию среды до полной прозрачности и ее стерилизацию при температуре  $120 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 30 мин.

**Методы.** Определение физических свойств, химического состава и биологических показателей жидких питательных основ проводили в соответствии с методиками, изложенными в Государственной Фармакопее Российской Федерации, издание XII, ч. I [2], ФС 42-3874-99 «Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов» [18], МУК 4.1/4.2588-96 «Методы контроля медицинских иммунологических препаратов, вводимых людям» [13], МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [12] и МУК 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза» [4]. В гидролизате дополнительно к регламентированным показателям, характеризующим химический состав питательной основы, определяли содержание кальция — методом де Ваарда, магния — методом Градиента, железа — методом колориметрии с роданистыми солями [20] и углеводов — фенол-серным методом [22].

Определение количества О-антигена в формализованной культуре *V. cholerae* O1 M-41 проводили регламентированным методом — реакцией преципитации с сывороткой холерной O1.

Все замеры проводили в трехкратном повторе в каждой серии основ.

Статистическую обработку результатов исследования физико-химического состава основ проводили с использованием программы «STATISTICA».

### Результаты и обсуждение

Фибрин — ценнейшее сырье, содержащее полноценный и сбалансированный по аминокислотному составу глобулярный белок, аминокислотный состав которого близок к таковому миозина, что дает основание для использования данного отхода при изготовлении питательных сред вместо мяса КРС. Фибрин также содержит

необходимые для питания бактерий соли натрия, калия, железа, фосфора, кальция [1, 15]. В отличие от белков мяса животных, фибрин состоит только из аминокислот и свободен от небелковых включений, что ускоряет расщепление белков на аминокислоты.

Для получения питательной основы фибрин, являющийся отходом на этапе получения иммунной сыворотки из плазмы, подвергали панкреатическому гидролизу. Из всего разнообразия методов гидролиза белков использовали ферментативный как более мягкий и щадящий. Для достижения максимального выхода продукта была оптимизирована предварительная подготовка фибрина. Это связано с тем, что ферментативный гидролиз глобулярных белков в нативном виде протекает недостаточно эффективно ввиду погружения активных молекул внутрь глобулы. Для лучшего расщепления белка в процесс гидролиза был включен этап предварительной денатурации прогреванием. Ферментативный гидролиз фибрина проводили до прекращения активного нарастания аминного азота, уровень которого составил через 7 сут. наблюдения от 0,5 до 0,7%, в зависимости от серии (табл. 1). Были получены три экспериментальные серии гидролизата фибрина, представляющие собой прозрачную жидкость темно-коричневого цвета.

Нами было проведено сравнительное изучение физико-химических свойств панкреатических гидролизатов фибрина, мяса КРС и казеина по следующим показателям: общий и аминный азот, хлориды, сухой остаток, пептон, железо, общий и неорганический фосфор, кальций, магний, % расщепления белка (см. табл. 1). Анализ данных продемонстрировал, что гидролизаты фибрина и пищевого сырья близки по большинству показателей, что вполне объяснимо при использовании одних и тех же технологических приемов при изготовлении гидролизатов. Однако гидролизат фибрина обладает преимуществом как более стандартный, поскольку для его изготовления используется сырье, партии которого имеют минимальные различия по общим биохимическим показателям, аминокислотному и минеральному составам, в отличие от мяса КРС.

Полученный гидролизат фибрина использовали в качестве питательной основы для приготовления экспериментальных ПС для культивирования микроорганизмов.

При оценке ростовых свойств ПС на основе гидролизата фибрина было установлено, что при выращивании на них тест-штаммов холерного вибриона и чумного микроба данные среды удовлетворяли нормативным требованиям методических документов (табл. 2). Как видно из таблицы 2, плотная питательная среда,

Таблица 1

**Сравнительная характеристика физико-химических свойств  
белковых гидролизатов из различного сырья**

Показатель	Гидролизат фибрина (экспериментальные серии)	Гидролизат мяса КРС (производственные серии)	Гидролизат казеина (производственные серии)
Описание	Прозрачная жидкость темно-коричневого цвета	Прозрачная жидкость темно-коричневого цвета	Прозрачная жидкость темно-коричневого цвета
Сухой остаток, %	6,06±1,16	8,05±0,99	10,27±0,62
Пептон, %	1,84±0,12	2,49±0,93	2,51±0,11
Углеводы, мкг	425±0,00	*	*
Железо, мкг	393±12	404±171	438±138
Фосфор неорганический, %	0,03±0,01	0,05±0,01	0,045±0,01
Фосфор общий, %	0,048±0,01	0,080±0,02	0,100±0,005
Хлориды, %	0,26±0,01	0,08±0,00	*
Кальций, %	0,0005±0,00	0,0018±0,0006	0,0100±0,00
Магний, %	0,0022±0,0002	0,0032±0,0021	0,0170±0,02
Общий азот, %	1,10±0,17	1,16±0,12	1,43±0,11
Аминный азот, %	0,56±0,11	0,72±0,08	0,93±0,11
% расщепления белка	48,55±4,02	61,83±3,17	64,13±2,15

Примечание: \* – не определяли

Таблица 2

**Характеристика биологических показателей экспериментальных и контрольных питательных сред  
с использованием тест-штаммов *Vibrio cholerae* O1 P-1 (145) и *Yersinia pestis* EV НИИЭГ**

Показатель	Питательная среда на основе гидролизата фибрина		Питательная среда на основе гидролизата по Хоттингеру	
	плотная	жидкая	плотная	жидкая
Скорость роста и морфология: <i>Vibrio cholerae</i> O1 P-1 (145) через 5 ч, Ø колоний (мм); через 12 ч, Ø колоний (мм)	- начальный рост; - типичные колонии, 2±0,2	- видимый рост; - типичный поверх- ностный рост	- начальный рост; - типичные колонии, 2±0,2	- видимый рост; - типичный поверх- ностный рост
<i>Yersinia pestis</i> EV НИИЭГ через 24 ч, Ø колоний (мм); через 48 ч, Ø колоний (мм)	- начальный рост; - типичные колонии с бугристым центром и «кружевной пери- ферией», 1±0,1	- видимый рост; - типичный придон- ный рост	- начальный рост; - типичные колонии с бугристым центром и «кружевной пери- ферией», 1±0,1	- видимый рост; - типичный придон- ный рост
Чувствительность и показатель прорастания (%): <i>Vibrio cholerae</i> O1 P-1 (145)	10 <sup>-7</sup> – 65,0±1,0 10 <sup>-6</sup> – 63,0±5,0	50,0±0,3 72,0±2,0 10 <sup>-7</sup> рост в 3 про- бирках	10 <sup>-7</sup> – 60,0±0,7 10 <sup>-6</sup> – 68,0±6,0	10 <sup>-7</sup> – 50,0±1,0 10 <sup>-6</sup> – 73,0±2,0 10 <sup>-7</sup> – рост в 3 про- бирках
<i>Yersinia pestis</i> EV НИИЭГ	10 <sup>-7</sup> – 58,0±1,0 10 <sup>-6</sup> – 57,0±4,0	«_»* «_»	10 <sup>-7</sup> – 60,0±1,5 10 <sup>-6</sup> – 58,0±5,0	«_» «_»
Эффективность (м.к./мл) <i>Vibrio cholerae</i> O1 P-1 (145)	8,0×10 <sup>9</sup> ±2,2×10 <sup>9</sup>	«_»	7,5×10 <sup>9</sup> ±1,5×10 <sup>9</sup>	«_»
<i>Yersinia pestis</i> EV НИИЭГ	4,5×10 <sup>9</sup> ±1,0×10 <sup>9</sup>	«_»	6,0×10 <sup>9</sup> ±2,2×10 <sup>9</sup>	«_»

Примечание: \* «\_» – исследование не проводили

приготовленная на основе гидролизата фибрина, обеспечивала рост тест-штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ из разведений  $10^{-6}$  и  $10^{-7}$  через 48 ч инкубации при температуре  $28 \pm 1$  °С в виде типичных колоний с бугристым центром и «кружевной» периферией, диаметром не менее 1 мм на всех чашках. Чувствительность и показатель прорастания среды составили соответственно из разведения  $10^{-6}$  –  $57,0 \pm 4,0\%$ , из разведения  $10^{-7}$  –  $58,0 \pm 1,0\%$ . Эффективность плотной питательной среды, приготовленной на основе гидролизата фибрина, имела значение  $4,5 \pm 1,0$  млрд. м.к./мл для *Y. pestis* EV НИИЭГ через 48 ч инкубации при температуре  $28 \pm 1$  °С.

Тест-штамм *V. cholerae* O1 P-1 (145) классического биовара при аналогичном посеве микробной взвеси из разведения  $10^{-6}$  и  $10^{-7}$  через 18–24 ч инкубации при температуре  $37 \pm 1$  °С образовывал типичные гладкие, округлые, прозрачные, голубоватые в проходящем свете колонии диаметром не менее 1 мм. Показатель чувствительности и показатель прорастания составили соответственно из разведения  $10^{-6}$  –  $63,0 \pm 5,0\%$ , из разведения  $10^{-7}$  –  $65,0 \pm 1,0\%$ . Эффективность плотной питательной среды, приготовленной на основе гидролизата фибрина, имела значение  $8,0 \pm 2,2$  млрд. м.к./мл для *V. cholerae* O1 P-1 (145) через 24 ч инкубации при температуре  $37 \pm 1$  °С.

Жидкая питательная среда, приготовленная на основе гидролизата фибрина, обеспечивала отчетливо видимый рост тест-штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ (прозрачный бульон с осадком на дне) из разведения  $10^{-5}$  во всех пробирках при высеве  $1 \times 10^3$  м.к. на 10 мл среды и из разведения  $10^{-6}$  во всех пробирках при высеве  $1 \times 10^2$  м.к. на 10 мл среды через 48 ч инкубации при температуре  $28 \pm 1$  °С.

При культивировании тест-штамма *V. cholerae* O1 P-1(145) классического биовара при  $37 \pm 1$  °С в течение 24 ч наблюдали характерный типичный рост из разведений  $10^{-6}$  и  $10^{-5}$ .

Об эффективности применения в производстве МИБП ПС, приготовленных на основе гидролизата фибрина, свидетельствуют данные экспериментального масштабированного выращивания штаммов *V. cholerae* O1 M-41, используемого для изготовления холерной бивалентной химической вакцины, и *V. cholerae* не O1 105, применяемого в качестве адсорбента при производстве холерной диагностической агглютинирующей сыворотки O1. При культивировании *V. cholerae* не O1 105 в ферментере объемом  $0,250$  м<sup>3</sup> на среде из гидролизата фибрина показатель эффективности составил 40 млрд. м.к./мл (условия культивирования:

$37 \pm 1$  °С, 24,5 ч), тогда как на традиционной среде из гидролизата мясного сырья – 18 млрд м.к./мл (условия культивирования:  $37 \pm 1$  °С, 23,5 ч) (рис. 1). При культивировании *V. cholerae* O1 M-41 в ферментере объемом  $0,5$  м<sup>3</sup> на среде из гидролизата фибрина этот показатель составил 158 млрд. м.к./мл (условия культивирования:  $37 \pm 1$  °С, 10 ч), в то время как на традиционной среде из казеинового гидролизата – 111,4 млрд. м.к./мл (условия культивирования: ( $37 \pm 1$  °С, 9 ч) (рис. 2).

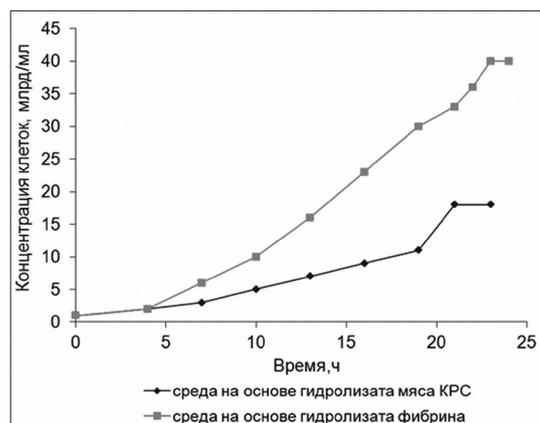


Рис. 1. Эффективность жидких питательных сред для глубинного культивирования *V. cholerae* не O1 105

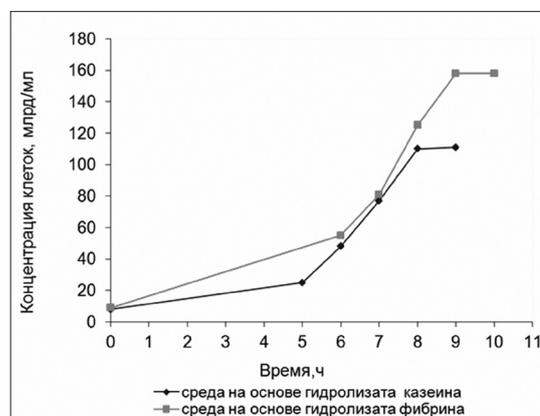


Рис. 2. Эффективность жидких питательных сред для глубинного культивирования *V. cholerae* O1 M-41

Следовательно, показатель эффективности сред, полученных на основе гидролизата фибрина, в 1,5–2 раза выше по сравнению со средами, полученными на основе гидролиза мяса и казеина. При определении количества O-антигена в центрифугате формализированной культуры *V. cholerae* O1 M-41, выращенной на бульоне из гидролизата фибрина и традиционном казеиновом бульоне, регистрировали положительную реакцию в разведении соответственно  $1/_{16}$  и  $1/_{8}$ .

По результатам проведенных исследований получен патент на изобретение «Питательная среда для глубинного культивирования холерного вибриона», № 2425866 РФ, МПК С12N1/20, С12R1/63, опубл.10.08.2011, бюл. № 22.

### Заключение

Таким образом, из отхода производства гетерологичного АИГ — фибрина — в результате панкреатического гидролиза получена питательная основа для изготовления микробиологических сред. Сконструированные экспериментальные ПС обеспечивали эффективный рост тест-штаммов холерного вибриона и чумного микроба с характерными морфологическими и тинкториальными свойствами. Замена в ПС мясной и казеиновой основы на гидролизат фибрина позволит существенно сократить себестоимость ПС без потери их эффективности.

### Литература

1. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. 3-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 1982. — 464 с.
2. Государственная Фармакопея Российской Федерации, издание XII, ч. I. — М., 2008. — 704 с.
3. Калягина С.Ю. Создание питательной среды из отходов мясного сырья и оценка ее свойств // Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 2008. — № 3. — С. 91–94.
4. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, бруцеллеза, легионеллеза: Методические указания МУ 3.3.2.2124-06 // Бюллетень Госсанэпиднадзора. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. — № 4. — С. 119–144.
5. Кострова О.М., Алешкин В.А. Способ получения препарата противогерпетического иммуноглобулина человека // Патент РФ № 2051054, А61К39/395. 1995.
6. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Киреев М.Н., Плотников О.П., Грачева И.В., Виноградова Н.А. и др. Способ получения питательной основы и питательная среда для культивирования микроорганизмов рода *Yersinia* и *Vibrio* // Патент РФ № 2360962, С12N1/20. 2009. Бюл. № 19.
7. Курилова А.А., Таран Т.В., Катунина Л.С., Головнева С.И. Разработка питательных сред из растительного сырья для культивирования возбудителей особо опасных инфекций // Пробл. особо опасных инф. — 2009. — № 3. — Вып. 101. — С. 66–68.
8. Кускова Э.Р., Осипова Е.Г., Сергеева И.А. и др. Изучение возможности замены аминокислоты на гидролизат  $\beta$ -глобулина крови человека при репродукции вируса клещевого энцефалита / Тезисы конференции «Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов». — М.: С. 190–192.
9. Матвеевская Н.С., Алешкин В.А. Способ выделения С4-компонента комплемента человека // Патент РФ № 94025651, А61К35/14. 1996.
10. Матвеевская Н.С., Алешкин В.А. Способ выделения фрагмента 3СD компонента С3 комплемента человека // Патент РФ № 2068694, А61К35/14, 35/16. 1996.
11. Мац А.Н., Перепечкина Н.П., Воейкова Е.С., Райхер Л.И., Райхер И.И., Старков Б.А. и др. // Патент РФ № 2076715, А61К35/16. 1997.
12. Методы контроля бактериологических питательных сред: Методические указания МУ 4.2.2316-08. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. — 67 с.
13. Методы контроля медицинских иммунологических препаратов, вводимых людям: Методические указания МУ 4.1/4.2588-96. — М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1998. — 128 с.
14. Першин Б.Б., Кузьмин С.И., Филатов Н.Н. Сорбированные иммуноглобулины животных — резерв для увеличения выпуска лечебных антитоксических и диагностических сывороток // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 1994. — № 4. — С. 96–100.
15. Раскин Б.М. Отечественные сухие питательные среды и перспективы их разработки // Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунол. — 1985. — № 5. — С. 25–32.
16. Ситьков В.И., Заерко В.И., Сурмило А.П., Туттов И.К., Колпакова Р.Г. Способ получения гидролизатов и использование их при изготовлении питательных сред для культивирования микроорганизмов // Патент РФ № 96112604, С12N1/00. 1998.
17. Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение. — М.: Аграрная наука, 2000. — 296 с.
18. Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов. Фармакопейная статья ФС 42-3874–99. — М.: Фармакопейный государственный комитет, 2000. — 77 с.
19. Цыганкова С.И., Трусова Л.И., Простяков А.П. и др. Использование отходов глобулинового производства для изготовления гидролизатов. Контроль, стандартизация применение химиотерапевтических и биологически активных препаратов, кормовых добавок и премиксов / Труды ВГНКИ. — 1985. — С. 62–66.
20. Шапиро Д.К. Практикум по биологической химии / Под ред. академика АН БССР А.С. Вечера. Изд. 2-е, перераб. и доп. — Минск.: «Высшая школа», 1976. — 285 с.

21. Шапиро М.М. Основные направления природоохранной деятельности микробиологической отрасли промышленности // Биотехнология. — 1988. — Т. 4. — № 2. — С. 254–261.
22. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Analytical Chemistry. — 1956. — Vol. 28. — № 3. — P. 350–356.

Список сокращений

АИГ — антирабический иммуноглобулин,  
КРС — крупный рогатый скот,  
МИБП — медицинский иммунобиологический препарат,  
ПЖ — поджелудочная железа,  
ПС — питательная среда,  
ФС — фармакопейная статья.

## BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS OF PROCESSING OF FIBRIN – WASTE PRODUCTION OF HETEROLOGOUS RABIES IMMUNOGLOBULIN

I.M. ZHULIDOV, E.G. ABRAMOVA, M.V. ANTONYCHEVA, A.K. NIKIFOROV, I.V. SHULGIN,  
O.A. LOBOVIKOVA, N.I. VAHRUSHINA, C.A. EREMIN, T.V. ALENKINA

*FKUZ «Russian Scientific Research Institute Antiplague «Microbe», Saratov*

Considered biotechnological aspects of processing and the use of fibrin — a waste production of heterologous rabies immunoglobulin. Optimized technology for pancreatic fibrin hydrolysate and studied its physical and chemical properties in comparison with the traditional raw hydrolysates — casein and beef cattle. The possibility of using fibrin hydrolysate as the protein basis of nutrient media for culturing microorganisms was confirmed.

*Keywords:* heterologous rabies immunoglobulin, waste production, fibrin, hydrolysate, nutritional basis, growth medium, physico-chemical composition, growth properties.

## ГЕМАТОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКДИСТЕРОИДСОДЕРЖАЩЕЙ СУБСТАНЦИИ СЕРПИСТЕН

Н.А. МОЙСЕЕНКО<sup>\*</sup>, Ж.Е. ИВАНКОВА<sup>1</sup>, Е.Н. РЕПИНА<sup>1</sup>, В.В. ВОЛОДИН<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Сыктывкарский государственный университет,

<sup>2</sup> Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар

Исследовано влияние экдистероидсодержащего препарата Серпистен на показатели крови лабораторных животных (крысы, кролики) в норме и при вызванных гемолитической (фенилгидразин) и постгеморрагической (кровопускание) анемиях. Установлено, что на фоне гемолитической анемии у крыс введение Серпистена снижает уровень ретикулоцитоза по сравнению с животными, которым вводился гемолитик, сдвигая его к уровню интактных животных. В крови при этом было уменьшено число эритроцитов с тельцами Гейнца, а также количество ауторозеток. Показано, что в условиях гемолитической анемии введение Серпистена улучшает показатели фагоцитарной активности и суммы поглощенных клеток. Аналогичные эффекты Серпистена наблюдали и в экспериментах на кроликах с кровопусканием. Серпистен может рассматриваться как потенциальное гематопротекторное средство.

**Ключевые слова:** фитоэкдистероиды, Серпистен, гематопротекторное действие.

### Введение

Фитоэкдистероиды — полигидроксилированные стероидные соединения, структурно близкие гормонам линьки и метаморфоза насекомых, обладающие фармакологическим действием на млекопитающих и человека. Известно более 250 различных экдистероидов, найденных в растениях. Наиболее перспективными в качестве источников экдистероидов являются растения из родов *Serratula* (*Astraceae*) и *Silene* (*Caryophyllaceae*) [14]. Мы исследовали действие на показатели крови экдистероидсодержащей субстанции Серпистен (далее — Серпистен), которая была выделена из надземной части растений серпухи венценосной (*Serratula coronata* L.) в лаборатории биохимии и биотехнологии Института биологии Коми НЦ УрО РАН [10]. В этой же работе было проведено всестороннее изучение ее химических свойств. Состав субстанции: 20-гидроксиэкдизон (20E) — 80, инокостерон — 11, экдизон — 4% и другие минорные компоненты. К настоящему времени еще не выявлен весь спектр благоприятного фармакологического действия фитоэкдистероидов, а также не

установлен полностью механизм их действия на высших теплокровных животных.

Цель данной работы заключалась в исследовании влияния Серпистена на показатели крови лабораторных животных (крысы, кролики) в норме и при вызванных гемолитической (фенилгидразин) и постгеморрагической (кровопускание) анемиях.

### Материалы и методы

Материалом исследования служила смешанная артерио-венозная кровь, которую брали методом тотального обескровливания путем декапитации (крысы) на фоне легкого хлороформного наркоза, стабилизировали гепарином в разведении 1:1 в 0,9%-ном растворе NaCl. У кроликов кровь для текущего анализа брали пункцией краевой вены уха в объеме 1,0–1,3 мл, при кровопускании — 20% общего ее объема, исходя из расчета 5,4% массы тела [5].

Параметры красной и белой крови определяли известными в лабораторной и клинической практике методами [7]. Концентрацию ретикулоцитов (Рт) определяли пробирочным методом Гейльмейера с учетом возрастных стадий созревания клеток. Одновременно определяли количество клеток с тельцами Гейнца. Щелочерезистентность гемоглобина (Hb) определяли по Зингеру [12] в нашей модификации: резистентность Hb определяли в течение более длительного времени (3, 5, 10 и более мин.) в том случае, если требовался больший период действия

© 2011 г. Мойсеенко Н.А., Иванкова Ж.Е., Репина Е.Н., Володин В.В.

**\* Автор для переписки:**

Мойсеенко Нелли Алексеевна

к.б.н., доцент Сыктывкарского государственного университета

167005 Сыктывкар, ул. Петрозаводская, 120

E-mail: volodin@ib.komisc.ru

денатурирующего агента, в качестве которого использовался гидроксид натрия; в работе применяли 5%-ные гемолизаты эритроцитов (Эр). Электрофоретические свойства Нв определяли с помощью электрофореза в вертикальных блоках, полиакриламидного геля — по Г. Мауреру [8] в модификации для химической полимеризации гелей (система № 1). Кислотную резистентность Эр определяли по И.И. Гительзону и И.А. Терскову [3], используя 0,002 н HCl и отслеживая процесс гемолиза Эр каждые 15 с. Осмотическую резистентность Эр определяли унифицированным методом с использованием раствора хлорида натрия с убывающей (интервал 0,05%) концентрацией от 0,9 до 0,2% в известной модификации Л.И. Идельсона. Резервные возможности поверхностной мембраны и осморегуляции лейкоцитов определяли по методу М.З. Федоровой и В.Н. Левина [13]. Диаметры эритроцитов и лейкоцитов измеряли прямым микроскопическим методом под масляной иммерсией с помощью микрометра окулярного винтового МОВ-1 [12]. Морфо-функциональные характеристики Эр и лейкоцитов (размеры, форма, площадь поверхности) определяли расчетным путем [7, 12]. Число розеткообразующих клеток определяли по методу Д.И. Бельченко [1]. Фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов определяли методом дрожжевого фагоцитоза [6]. Адгезионные свойства лейкоцитов определяли по методу Л.Г. Зайцева [4]. Гемолитическую анемию вызывали двух-трехкратными подкожными инъекциями 2,5%-ного раствора мощного гемолитика фенилгидразина (ФГ) в 0,9%-ном растворе NaCl [11]. В работе использовали 0,3%-ное разведение Серпистена в физиологическом растворе, который инъецировали внутримышечно по 5–20 мкг/кг (до анемизации животных и на фоне анемии). Физиологический раствор (0,9%-ный водный раствор NaCl) использовали в качестве плацебо (контроль).

### Результаты и обсуждение

Показано, что в ответ на введение ФГ или кровопускание в крови крыс и кроликов соответственно отмечается снижение концентрации Эр, Нв и показателя гематокрита по сравнению с интактными, что указывает на развитие анемии. Это повлекло за собой снижение вязкости крови и увеличение скорости оседания Эр. Указанные изменения наиболее выражены в ответ на введение гемолитического яда, слабее — в ответ на введение ФГ на фоне предварительных инъекций Серпистена и наименее — на кровопускание. При гемолитической анемии в крови существенно ( $p < 0,001$ ) увеличивается количество

телец Гейнца, которые представляют собой преципитат денатурированных под влиянием ФГ липидов и белков поверхностных мембран Эр и содержащегося в них Нв [2, 15, 16], то есть служат проявлением гемотоксического действия этого гемолитического яда. Доля Эр с тельцами Гейнца — индикатор глубины анемии. В связи с этим интересно отметить, что в случае развития гемолитической анемии на фоне предварительного введения Серпистена доля Эр с тельцами Гейнца оказывается существенно ниже ( $p < 0,01$ ), чем в случае реакции только на введение ФГ —  $43,5 \pm 1,8$  и  $89,5 \pm 1,5\%$ , соответственно. Это подтверждает вышеупомянутое предположение о менее глубокой анемизации крыс в случае, если анемия развивалась на фоне предварительных инъекций Серпистена. В этом мы видим гематопротекторное и адаптогенное действие Серпистена, в основе которого лежат его мембраностабилизирующие свойства [14]. В зимний период названные эффекты более выражены, нежели в летний, что, по-видимому, является отражением сезонных перестроек поверхностных мембран Эр.

Кроме того, в ответ на введение ФГ в крови крыс наблюдается резкое увеличение количества ауторозеток ( $p < 0,001$ ). Феномен ауторозеткообразования заключается в прилипании Эр к моно- и гранулоцитам с образованием структур, напоминающих розетки. Они способствуют освобождению крови от патологически измененных, поврежденных или стареющих Эр [1]. Инъекции Серпистена приводят к снижению в крови крыс количества ауторозеток, что свидетельствует о «нормализации» состояния поверхностных мембран Эр и, как результат, меньшей подверженности их действию гемолитического яда ФГ.

Свидетельством повреждения мембраны при действии ФГ является также снижение осмотической резистентности Эр, причем, в крови отчетливо выделяются популяции Эр с низкой устойчивостью к гипотонической среде (рис. 1). Предварительные инъекции плацебо или Серпистена приводили к тому, что осмотическая резистентность Эр в ответ на инъекции ФГ практически не изменялась по сравнению с интактными животными. При этом резистентность Эр при действии Серпистена более близка к значениям, полученным для интактных животных, по сравнению с действием физиологического раствора. Данный факт можно считать проявлением адаптивного и мембраностабилизирующего действия субстанции. В аналогичных экспериментах с лейкоцитами показано, что в ответ на ФГ «резервные возможности» их поверхностных мембран используются максимально. В итоге большое количество клеток погибает. В ответ же на

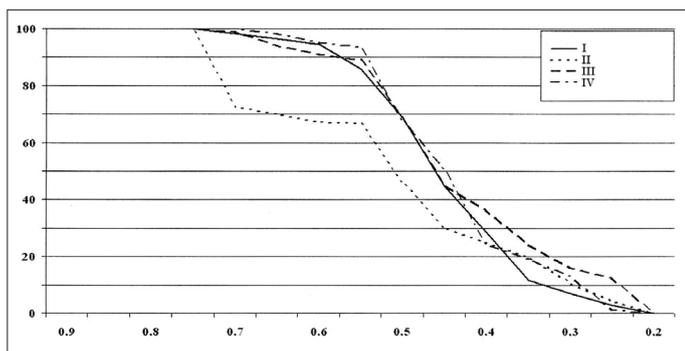


Рис. 1. Осмотическая резистентность эритроцитов крыс. Условные обозначения: I – интактные, II – фенилгидразин, III – Серпистен + фенилгидразин, IV – фенилгидразин в физиологическом растворе. По оси абсцисс – концентрация растворов NaCl, %. По оси ординат – количество резистентных клеток, %

введение Серпистена, независимо от дозы, мембранный резерв используется неполно, то есть Серпистен оказывает мембраносберегающее действие через стабилизацию мембран.

Благоприятным прогнозом выхода из состояния анемии служит увеличение в крови доли незрелых Эр – Рт, концентрация которых является показателем интенсивности работы органов кроветворения. Особенно сильно увеличивается доля Рт в ответ на ФГ: с 15–23 (группа интактных животных) до 176–360‰ (группа опытных животных с вызванной гемолитической анемией), то есть в 8–18 раз. В крови появляются Рт II стадии зрелости по Гейльмейеру (рис. 2), которые отсутствуют у интактных животных, свидетельствуя о значительной интенсификации кроветворения.

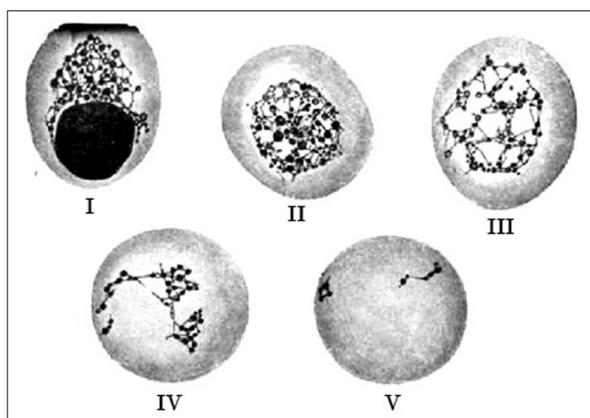


Рис. 2. Ретикулоциты. Римскими цифрами обозначены стадии зрелости по Гейльмейеру

Введение Серпистена снижает уровень ретикулоцитоза по сравнению с животными, которым вводился только ФГ, сдвигая его к уровню интактных (адаптивный

эффект Серпистена). При этом «нормализация» уровня Рт сильнее выражена в тех опытах, в которых Серпистен вводили до инъекции ФГ, то есть анемизация животных оказывалась менее глубокой (мембраностабилизирующий эффект).

В крови в данном случае не отмечали Рт II стадии зрелости, было уменьшено число Эр с тельцами Гейнца и количество ауторозеток. Все это – свидетельства нормализации состояния Эр и лейкоцитов и их поверхностных мембран через стабилизацию. В любом варианте анемизации отмечено ускорение созревания Рт, о чем судили по сдвигу возрастной ретикулоцитарной формулы влево, в сторону более молодых форм, и уменьшению в крови доли более зрелых клеток.

Изменения состояния Эр сказываются на их функциях и на физико-химических и функциональных показателях (содержание в них Hb).

Нами проведен анализ изменения показателей фагоцитоза крыс Уистар под действием Серпистена на фоне гемолитической анемии (ФГ при введении в дозе 7,5 мг/кг двукратно). Как и ожидалось, фагоцитарная активность лейкоцитов существенно снижается при действии ФГ (табл. 1).

Таблица 1  
Показатели фагоцитоза самцов (верхняя строка) и самок (нижняя строка) крыс Уистар при действии фенилгидразина и Серпистена

Показатель, %	Группа		
	А	Б	В
Фагоцитарная активность нейтрофилов и моноцитов	44,2±0,4	28,2±0,9**	55,9±2,7**a
	44,4±1,5	27,6±4,1*	67,7±5,8**a
Сумма поглощенных клеток	94,4±3,6	64,5±2,0**	138,3±12,9**a
	135,1±3,6	66,6±9,2*	162,4±11,8
Фагоцитарный индекс	2,1±0,1	2,3±0,1	2,4±0,2
	3,0±0,8	2,4±0,1	2,5±0,5

Примечание: А – интактная группа, Б – фенилгидразин, В – фенилгидразин + Серпистен. В каждой группе было по восемь самцов и восемь самок.

Различия достоверно при \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ ; различия с фенилгидразиновой группой достоверно при  $p < 0,01$ ;

Однако, если ФГ вводили на фоне предварительной инъекции Серпистана (20 мг/кг), то гемолитический эффект не проявлялся, по-видимому, вследствие нормализации структурно-функциональной организации поверхностной мембраны под действием изучаемого препарата. Более того, показатели фагоцитарной активности и суммы поглощенных клеток в группе животных, получавших Серпистен, даже превышают уровень интактных. Наблюдаемые реакции нами рассматриваются как одновременное проявление мембраностабилизирующего и стимулирующего фагоцитарную активность лейкоцитов действия Серпистана. Продемонстрировано также, что под влиянием Серпистана снижаются адгезионные способности лейкоцитов, что, в свою очередь, должно приводить к улучшению микроциркуляции крови.

Параллельно изменениям свойств поверхностной мембраны Эр изменяются физико-химические характеристики Нб. В опытах *in vitro* было найдено, что обработка цельных Эр крыс раствором ФГ приводит к снижению относительной электрофоретической подвижности всех фракций Нб по сравнению с интактными (рис. 3).

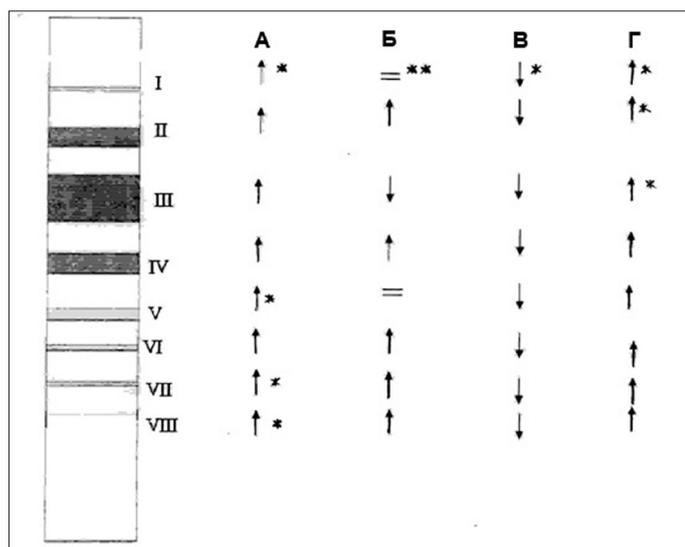


Рис. 3. Схема электрофореграммы гемоглобина крыс. Римскими цифрами обозначены номера анодных фракций гемоглобина согласно их подвижности в электрическом поле; стрелками — направления изменения электрофоретической подвижности фракций. Изменения электрофоретической подвижности фракций Нб животных опытных групп по сравнению с интактными животными достоверны (\*) ( $p < 0,05$ ) или отсутствуют (\*\*).

Условные обозначения: А — эритроцитарная масса с добавлением 20Е; Б — гемолизат с добавлением 20Е; В — эритроцитарная масса, обработанная ФГ; Г — эритроцитарная масса, обработанная смесью 20Е и ФГ

При сочетанном действии ФГ и 20Е наблюдали противоположный эффект: электрофоретическая подвижность всех фракций Нб повышалась. Аналогичный эффект наблюдали и при обработке эритроцитарной массы только раствором 20Е, причем он более выражен, чем в присутствии ФГ: относительная электрофоретическая подвижность всех семи фракций Нб увеличивалась. Сочетанное действие Серпистана и ФГ дает тот же эффект, что и собственно Серпистен, то есть мембрана Эр в присутствии Серпистана не реагирует на гемолитический яд. Обработка же гемолизатов (водных растворов Нб) либо не изменяет, либо незначительно изменяет подвижность фракций. Отсюда следует, что изменения зарядных свойств Нб обусловлены, прежде всего, изменениями поверхностной мембраны, с которой молекулы Нб связаны структурно [9], то есть Серпистен оказывает отчетливое мембраностабилизирующее действие не только в условиях *in vivo*, но и *in vitro*. При этом изменяется и щелочерезистентность Нб, свидетельствуя об изменении конформации молекул. Надо указать на то, что изменения щелочерезистентности противоположны изменениям электрофоретической подвижности. Изменения физико-химических свойств Нб должны сказываться на его функциональных свойствах.

Аналогичные эффекты Серпистана наблюдали и в экспериментах на кроликах с кровопусканием. Было обнаружено, что в этих условиях по сравнению с интактными животными происходит ускорение восстановления всех показателей крови после дозированной кровопотери. Концентрация Эр восстанавливается уже к девятому, а Нб и Рт — к 15-му дню с ускорением созревания последних, тогда как без инъекции Серпистана восстановление концентрации Нб происходит только к 18–21-му дню, а Рт — к 28-му дню. Кривые осмотического и кислотного гемолиза Эр, отслеживаемые через каждые три дня после кровопотери, на фоне Серпистана имеют гораздо меньший разброс. Ретикулоцитоз также плавно нарастал, достигая максимума к девятому дню, а затем так же постепенно снижался. В целом следует отметить, что явление анемизации при кровопускании выражено гораздо слабее, чем при действии гемолитического яда.

### Заключение

Таким образом, Серпистен может рассматриваться как потенциальное гематопротекторное средство, прежде всего, при гемолитических анемиях, благодаря стабили-

зации мембран Эр, а также как средство, облегчающее выход организма из патологического состояния анемии благодаря гематостимулирующему и активирующему фагоцитоз действию.

*Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН № 21 «Фундаментальные науки — медицине» (проект № 09-П-4-1013: «Молекулярно-клеточные механизмы стресс-устойчивости и оценка возможности фитотерапевтической коррекции адаптивных реакций организма в неблагоприятных условиях окружающей среды, высоких физических и психо-эмоциональных нагрузок»).*

## Литература

1. Бельченко Д.И. Внутрисосудистое ауторозеткообразование при гемолитической анемии // Гематол. трансфузиол. — 1992. — № 4. — С. 23–25.
2. Василенко Н.М. Действие ксенобиотиков на систему крови / В кн.: Общая токсикология. — М.: Медицина, 2002. — С. 258–259.
3. Гительзон И.П., Терсков И.А. Метод кислотных эритрограмм // Биофизика. — 1957. — Вып. 2. — С. 259–266.
4. Зайцев Л.Г. Комплексный анализ гемореологических профилей у мужчин и женщин при разных функциональных состояниях организма: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — М., 2000. — 32 с.
5. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. Лабораторные животные. — Киев: Выща школа, 1974. — 304 с.
6. Иммунологические методы. — М.: Медицина, 1987. — 472 с.
7. Лабораторные методы исследования / Ред. В.В. Меньшиков. — М.: Медицина, 1987. — 369 с.
8. Маурер Г. Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле. — М.: Мир, 1971. — 215 с.
9. Молчанова Т.П. Основы молекулярной организации белков мембраны эритроцитов и их дефекты, приводящие к гемолитическим анемиям // Гематол. трансфузиол. — 1989. — № 7. — С. 32–41.
10. Патент № 2153346, Российская Федерация, МКИЗ А61К35/78. Способ получения экидистероидов / В.В., Володин, С.О. Володина; Институт биологии Коми НЦ УрО РАН; № 99106351/14; заявл. 29.03.99; опубл. 27.07.2000. Бюл. № 21.
11. Стародуб Н.Ф. Изучение свойств фракций гемоглобина крыс // Биохимия. — 1974. — Т. 39. — № 4. — С. 757–761.
12. Тодоров Й. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. — София, 1963. — 665 с.
13. Федорова М.Э., Левин В.Н. Метод комплексного исследования геометрии, площади поверхности, резервных возможностей мембраны и осморегуляции лейкоцитов крови // Клиническая диагностика. — 1997. — № 11. — С. 44–46.
14. Фитоэкидистероиды / Под ред. В.В. Володина. — СПб.: Наука, 2003. — 293 с.
15. Gross P. Biological activity of hydroxyl-amine // CRC Crit. Rev. Toxicol. — 1985. — Vol. 14. — P. 87–99.
16. Nitric oxide. Part B: Physiol. and Pathol. Processes. Packer L. (Ed.) // Methods Enzymol. — 1996. — Vol. 269. — P. 66–78.

## HEMATOPROTECTIVE EFFECT OF ECDYSTEROID CONTAINING PREPARATION SERPISTEN

N.A. MOYSEENKO<sup>1</sup>, J.E. IVANKOVA<sup>1</sup>, E.N. REPINA<sup>1</sup>, V.V. VOLODIN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Syktyvkar State University,

<sup>2</sup> Institute of Biology, Komi Science Centre, Ural Branch, RAS, Syktyvkar, Russia

The influence of the drug ecdysteroid Serpisten on blood values of laboratory animals (rats, rabbits) in normal and induced hemolytic (phenylhydrazine) and posthemorrhagic (cupping) anemia. It is established that in the context of hemolytic anemia in rats the Serpisten injection reduces reticulocytosis compared with animals injected with hemolytic, shifting it to the level of intact animals. In the blood, and it was reduced by the number of erythrocytes with Heinz bodies, as well as the number of autorosettes. It is shown that in hemolytic anemia Serpisten injection improves the phagocytic activity and the amount of absorbed cells. Similar effects of Serpisten were observed in experiments on rabbits with a cupping. Serpisten can be considered as a potential hematoprotective drug.

*Keywords:* phytoecdysteroids, Serpisten, hematoprotective effect.

## АНТИАГРЕГАЦИОННОЕ И СТРЕСС-ЛИМИТИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКДИСТЕРОИДСОДЕРЖАЮЩЕЙ СУБСТАНЦИИ СЕРПИСТЕН

Н.Б. ПЕТРОВА<sup>1\*</sup>, В.В. ВОЛОДИН<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Сыктывкарский государственный университет,  
<sup>2</sup> Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар

Исследовано действие экдистероидсодержащего препарата Серпистен и преднизолона на адренореактивность эритроцитов и состояние симпато-адреналовой системы крыс в покое и при иммобилизационном стрессе. Показано, что при введении за 24 ч до иммобилизации у крыс Серпистен способствует сохранению исходной адренореактивности эритроцитов и препятствует чрезмерной активации симпато-адреналовой системы. У человека двухнедельный прием Серпистена приводит к стимуляции эритропоэза и снижению десенситизации клеточных мембран к действию катехоламинов. В обоих случаях применение Серпистена приводит к снижению ответа на стрессорное воздействие.

**Ключевые слова:** симпато-адреналовая система, адренореактивность, реакция агглютинации эритроцитов, фитоэкдистероиды, Серпистен.

В последнее десятилетие возрос интерес к использованию при различных патологиях и дизадаптивных состояниях препаратов природного происхождения — адаптогенов, обладающих в большинстве случаев малой токсичностью и широким спектром регулирующих эффектов. Одним из новых адаптогенных средств является Серпистен, представляющий собой смесь очищенных экдистероидов из растения серпухи венценосной (*Serratula coronata* L.) [2]. К настоящему времени показан ряд положительных эффектов Серпистена на физиологические функции млекопитающих. В литературе имеется достаточно данных, указывающих на существенную роль вегетативной нервной системы и ее адренергического звена в регуляции системы крови в ответ на стрессорные воздействия, а также неоспоримо значение адренергической системы для реализации эффекта адаптогенов [17]. Однако механизмы ее участия для проявления эффектов фитоэкдистероидов (ФЭС) неизвестны.

Цель настоящей работы — охарактеризовать свойства эритроцитарной мембраны (агглютинабельность, адренореактивность) и состояние симпато-адреналовой системы у млекопитающих (крыса, человек) при дей-

ствии стрессорных факторов и их возможную коррекцию с помощью препаратов стероидной природы (Серпистена и синтетического аналога глюкокортикоидных гормонов — преднизолона).

### Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 73 самцах (масса  $230 \pm 18$  г) белых беспородных крыс (возраст 3–4 и 12 мес.). Иммобилизационный стресс вызывали жесткой фиксацией крысы в положении лежа на спине на 30 мин. Серпистен в дозе 20 мг/кг массы животного вводили внутримышечно (в виде 0,3%-ного раствора) за 24 ч до иммобилизационного стресса. Для выяснения механизма действия Серпистена были проведены дополнительные исследования с использованием синтетического аналога глюкокортикоидных гормонов позвоночных — преднизолона (Индия), который также вводился за 24 ч до иммобилизации животного, но в меньшей дозе — 5,71 мг/кг (из расчета максимально допустимой концентрации для терапевтического эффекта). Кровь крыс брали методом тотального обескровливания путем декапитации животных после легкого хлороформного наркоза. Кровь стабилизировали гепарином. Все эксперименты проводили с соблюдением биоэтических правил.

Проведены исследования по влиянию Серпистена (Гр № 77.99.23.3.У.1923.3.08) на показатели периферической крови и состояние симпато-адреналовой системы (САС) человека. Испытуемые — практически здоровые люди: девять юношей и пять девушек в возрасте 18–22

© 2011 г. Петрова Н.Б., Володин В.В.

\* **Автор для переписки:**

Петрова Наталья Борисовна  
к.б.н., доцент кафедры физиологии человека и животных  
Сыктывкарского государственного университета  
167001, Республика Коми, Сыктывкар, Октябрьский пр-т, 55  
E-mail: nbp1959@yandex.ru

лет принимали per os Серпистен (5 мг Серпистена ежедневно в течение двух недель утром после легкого завтрака). В качестве стрессирующего агента использовали физическую нагрузку (проба Летунова), которая предназначена для оценки адаптации организма к работе на выносливость. Медицинский персонал забирал кровь в специально оборудованном помещении утром натошак венопункцией из локтевой вены до и после двухнедельного приема субстанции биологически активной добавки Серпистен, до и после физической нагрузки. Показатели периферической крови определяли общепринятыми в лабораторной и клинической практике методами [5].

Агрегационную способность эритроцитов (Эр) оценивали с помощью метода фитогемагглютинации с использованием лектинов — фитогемагглютининов (ФГА). Растворы ФГА получали путем экстрагирования их из размолотых семян гороха посевного (*Pisum sativum*). Количественное измерение реакции агглютинации проводили в камере Горяева на 10-, 20-, 30- и 40-й мин. наблюдения [10]. ФГА обладают свойством избирательно связываться с олигосахаридными участками интегральных гликопротеидов мембраны Эр. Результатом развивающегося взаимодействия является склеивание Эр друг с другом — реакция агглютинации Эр (РАЭ). Оценку состояния САС и адренореактивности организма крысы и человека осуществляли с помощью метода фитогемагглютинации в сочетании с пропранололовым тестом [15] и дополнительно для человека — методом осмотического гемолиза Эр с добавлением  $\beta$ -адреноблокатора [3]. Статистическую обработку проводили с применением параметрических и непараметрических методов. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента [6]. Для расчетов и графической обработки данных использовали приложение Microsoft Office 97, Microsoft Excel 8.0.

### Результаты и обсуждение

Известно, что независимо от видовой или половой принадлежности, возраста, функционального состояния организма человека и животных РАЭ на ФГА с течением времени (с 10-й по 40-ю мин. наблюдения) возрастает. Однако степень увеличения в значительной степени варьирует и зависит от состояния мембраны Эр и воздействий, оказываемых на нее [14].

**Влияние Серпистена на свойства эритроцитарной мембраны и активность САС крыс.** У интактных крыс на 10-й мин. наблюдения РАЭ составляла 27–28%, на 40-й мин. доля агглютинировавших Эр

возрастала у 3–4- и 12-месячных крыс до 65 и 56%, соответственно (табл. 1, 2). Под действием пропранолола (ПП) у всех крыс РАЭ снижалась. Выраженность и дозозависимость эффекта ПП определяется как состоянием эффекторного звена —  $\beta$ -адренорецепторов на мембранах клеток-мишеней, так и активностью центральных адренергических стресс-реализующих структур [8, 19]. Выраженность эффекта ПП на РАЭ у интактных крыс была высока и составляла на 10- и 40-й мин. 19–20 и 10–16%, соответственно. Значительное влияние на ПП свидетельствовало о неактивированном состоянии САС у интактных животных [15]. Наблюдалась линейная зависимость эффекта ПП от времени его действия: с увеличением времени действия эффект  $\beta$ -адреноблокатора снижался. Подобная зависимость отражает высокую адренореактивность Эр и сохранение нормального функционального состояния адренорецепторов на мембране Эр.

Иммобилизационный стресс значительно дестабилизировал мембрану Эр. Агглютинабельность Эр увеличивалась в 1,5–2,0 раза на 10-й мин. наблюдения. При иммобилизационном стрессе в сосудистое русло выходят депонированные «старые» Эр со сниженной активностью  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ азы и холинэстеразы [9]. Они обладают сниженным электрическим зарядом и поэтому быстро агглютинируют. Кроме того, известно, что при стрессе отмечается сдвиг рН крови в кислую сторону, что сказывается на состоянии мембран эритроцитов. Показано, что при метаболическом ацидозе (сахарный диабет) увеличивается вязкость крови, повышается агрегация, уменьшается деформируемость эритроцитов [1]. При любых видах стресса резко меняется соотношение синтоксических и катотоксических механизмов в сторону преобладания последних — стресс-реализующих. Нами продемонстрировано, что активность САС при иммобилизации у крыс значительно возрастает. Выраженность реакции Эр на ПП в пределах 2–4 и 9–11% соответственно у 3–4- и 12-месячных крыс свидетельствует о значительной активации катотоксических механизмов (см. табл. 1, 2).

Ранее был выявлен гематопротекторный эффект Серпистена у крыс [11]. Фитогемагглютинация Эр при многократном действии Серпистена в малых дозах была ниже показателей у интактных животных, адренореактивность Эр не изменялась. Преднизолон в покое также оказывал сходный (мембраностабилизирующий) эффект, уменьшая реакцию агглютинации Эр, вызванную ФГА (см. табл. 1, 2). При этом адренореактивность Эр преднизолоновых крыс изменялась.

Таблица 1

**Влияние стресса и Серпистена на реакцию агглютинации эритроцитов (%) крыс в контроле (верхняя строка) и под действием  $\beta$ -адреноблокатора пропранолола (нижняя строка)**

Время, мин.	Группа животных		
	А	Б	В
10-я	27,4±3,9	49,01±6,5 ***	28,5±8,5 $\Delta\Delta\Delta$
	21,8±6,8 $\diamond$	41,05±4,4 *** $\diamond\diamond$	19,4±8,5 $\Delta\Delta\Delta$ $\diamond\diamond\diamond$
20-я	32,1±5,0	57,02±6,5 ***	40,0±4,6 $\Delta\Delta$
	26,9±4,4 $\diamond$	52,0±4,1 *** $\diamond$	30,5±7,6 $\Delta\Delta\Delta$ $\diamond$
30-я	41,8±5,3	61,7±6,6 ***	53,1±4,5 $\Delta\Delta$
	33,8±3,6 $\diamond\diamond$	54,7±5,1 *** $\diamond$	41,9±7,2 $\Delta\Delta\Delta$ $\diamond\diamond$
40-я	56,0±3,0	68,1±6,8 ***	58,9±1,2 $\Delta\Delta\Delta$
	43,09±2,04 $\diamond\diamond$	60,2±6,3 *** $\diamond$	48,4±4,3 $\Delta\Delta\Delta$ $\diamond\diamond\diamond$

*Примечание:* различие статистически значимо между реакцией агглютинации эритроцитов крыс интактной (А) и стрессовой (Б) групп при  $p < 0,001$  (\*\*\*); стрессовой и серпистен + стресс (В) групп при  $p < 0,01$  ( $\Delta\Delta$ ) и  $p < 0,001$  ( $\Delta\Delta\Delta$ ); контрольной и опытной проб при  $p < 0,05$  ( $\diamond$ ),  $p < 0,01$  ( $\diamond\diamond$ ) и  $p < 0,001$  ( $\diamond\diamond\diamond$ )

Таблица 2

**Влияние стресса и преднизолон на реакцию агглютинации эритроцитов (%) крыс в контроле (верхняя строка) и под действием  $\beta$ -адреноблокатора пропранолола (нижняя строка)**

Время, мин.	Группа животных			
	А	Б	В	Г
10-я	28,32±1,67	21,7±1,35***	66,3±1,41*** $\Delta\Delta\Delta$	41,2±1,91*** $^{\circ\circ\circ}$
	23,17±3,72	22,16±2,66	64,8±1,9	37,5±2,5
20-я	46,5±1,97	35,6±1,22***	71,5±2,64*** $\Delta\Delta\Delta$	47,0±1,58*** $^{\circ\circ\circ}$
	37,8±3,8	34,14±2,38	68,5±3,28	43,9±1,78
30-я	53,7±1,52	48,7±1,03***	74,4±2,3*** $\Delta\Delta\Delta$	57,2±2,1*** $^{\circ\circ\circ}$
	45,9±1,56	47,1±1,61	72,86±2,27	50,7±1,28
40-я	65,1±1,94	57,7±2,44***	79,69±1,04*** $\Delta\Delta\Delta$	68,5±0,58*** $^{\circ\circ\circ}$
	58,7±1,81	56,1±2,68	76,9±0,8	61,9±1,43

*Примечание:* различие статистически значимо между реакцией агглютинации эритроцитов крыс интактной (А) и экспериментальной групп при  $p < 0,05$  (\*) и  $p < 0,001$  (\*\*\*), опытных 1 (Б) и 2 (Г) групп (преднизолон) при  $p < 0,001$  ( $^{\circ\circ\circ}$ ), опытной 1 и стресс- (В) групп при  $p < 0,001$  ( $\Delta\Delta\Delta$ )

На Эр этих крыс  $\beta$ -блокатор не действовал, отражая активированную САС. Известно, что глюкокортикоидные гормоны млекопитающих и их синтетические аналоги, в том числе и преднизолон, увеличивают чувствительность адренорецепторов к имеющимся в крови катехоламинам.

Введенные за 24 ч до иммобилизационного стресса оба препарата (Серпистен и преднизолон) оказывали защитный эффект, предотвращая стресс-индуцированную агрегацию Эр. Однако эффект ПП у крыс, получавших Серпистен на фоне иммобилизованного стресса, был максимален на всех минутах наблюдения, что свидетельствовало об отсутствии активации САС. Сохранялась четкая линейная зависимость эффекта ПП от времени его действия. При введении преднизолона на фоне иммобилизационного стресса реакция на ПП была умеренной (в пределах 9–11%). Кроме того, нелинейная зависимость ПП от времени его действия указывала на активное состояние САС и нарушение функционального состояния  $\beta$ -адренорецепторов на мембране Эр. То есть, Серпистен на фоне иммобилизации снижал активность САС. Преднизолон в покое повышал активность САС, а на фоне иммобилизационного стресса не справлялся с чрезмерной активацией САС. Следовательно, действие Серпистена и преднизолона на адренореактивность Эр и состояние САС у крыс как в покое, так и при стрессе различаются.

По современным представлениям, многие из позитивных эффектов адаптогенов реализуются через центральные структуры управления формированием стресс-реакции с обязательным участием гормонов адреномедуллярной и адренокортикальной систем [13, 20]. Показан стимулирующий эффект Серпистена на кору надпочечников лабораторных мышей, который проявлялся в увеличении ширины коры в основном за счет пучковой, отчасти сетчатой зон [16]. Таким образом, действие Серпистена на физиологические функции организма млекопитающих может быть опосредовано гормонами коры надпочечника, однако не сводится к действию последних.

**Влияние Серпистена на показатели периферической крови и активность САС человека.** Количественные и качественные показатели периферической крови отличались в контроле у юношей и девушек и соответствовали данным литературы [5]. Показатели фитогемагглютинации Эр по полу не различались и составляли на 10- и 40-й мин. наблюдения у юношей и девушек  $29,0 \pm 4,7$  и  $37,0 \pm 3,2$  и  $59,0 \pm 4,4$  и  $64,0 \pm 3,1\%$ , соответственно. Адренореактивность организма ( $\beta$ -АРМ)

в группе исследуемых лиц в покое была выше нормальных величин, характерных для неактивированной САС (2–20 усл. ед.), и составляла 13–46 усл. ед. — в среднем  $30,5 \pm 3,4$ . Показатели выше нормы наблюдались у 75% испытуемых. Вероятно, это связано с более высокой частотой встречаемости гиперадренергического состояния у северян [7].

Физическая нагрузка независимо от пола достоверно увеличивала количество Эр, показатель гематокрита и вязкость крови, но при этом наблюдали снижение средноклеточного объема Эр и средноклеточного содержания гемоглобина в них. Указанные изменения отражают выброс депонированной крови в ответ на физическую нагрузку. Агглютинабельность Эр при физической нагрузке увеличивалась в среднем в 1,5 раза. Активность САС повышалась, показатели  $\beta$ -АРМ увеличивались в среднем на 34% и составляли 19–49 усл. ед. — в среднем  $41,0 \pm 3,4$ .

Показатели периферической крови испытуемых после двухнедельного приема Серпистена изменялись. В покое было отмечено снижение количества Эр у 86% испытуемых. В показателях гематокрита и гемоглобина не наблюдали достоверных различий по сравнению с исходными уровнями до приема препарата. У всех испытуемых происходила интенсификация эритропоэза, на что указывало увеличение абсолютного количества ретикулоцитов и относительного количества ретикулоцитов III и IV степени зрелости. Ранее на крысах также был показан гемостимулирующий эффект Серпистена [12]. На лабораторных животных ранее был продемонстрирован и антиагрегационный эффект ФЭС, в том числе и Серпистена [1, 15]. У человека нами не было обнаружено однонаправленного действия препарата на агрегационные свойства Эр. Агглютинабельность Эр под действием препарата снижалась лишь у половины обследованных лиц. Показатели  $\beta$ -АРМ после приема Серпистена снижались у 73% испытуемых и приближались к нормальным величинам, что отражало снижение общей десентизации клеточных мембран.

После двухнедельного приема Серпистена изменилась реакция показателей крови на физическую нагрузку. Она стала менее выраженной, чем до приема препарата. Эритроцитоз, увеличение гематокрита, вязкости и снижение средноклеточного объема Эр были незначительными. Показатели фитогемагглютинации в ответ на нагрузку оставались относительно стабильными и даже снижались у 62% испытуемых. В целом по группам (юноши, девушки) наблюдалось снижение стресс-индуцированной агрегации Эр. Снижалась

также и выраженность активации САС в ответ на физическую нагрузку.

Таким образом, действие Серпистена на параметры периферической крови человека было неоднозначным. Однако проявлялась общая направленность эффекта Серпистена — снижался ответ на стрессорное воздействие. Мы полагаем, что в условиях стресса основное влияние Серпистен оказывает на центральные структуры реализации стресс-реакции, в результате чего снижается уровень медиаторов стресса (в том числе и катехоламинов), уменьшается выброс депонированной крови с Эр, обладающими нарушенными морфо-физиологическими характеристиками. Высказанное предположение находит подтверждение в данных литературы. Так, например, введение 20-гидроксиэкдизона крысам активизировало холинергические структуры мозга, в результате чего в гипоталамусе снижалась концентрация ацетилхолина и реципрокно увеличивалась концентрация норадреналина [4]. Одновременно в гипоталамусе возрастала концентрация ГАМК, которая играет роль неспецифического тормозного механизма, ограничивающего стрессовую реакцию и предупреждающего стрессорные повреждения. Показано также, что в циркулирующей крови снижался уровень медиаторов стресса — адреналина и норадреналина — и наблюдалось повышение содержания ацетилхолина и серотонина [22]. Имеются данные о том, что фитоэкдистероиды обладают способностью уравнивать процессы возбуждения и торможения за счет потенциации возбуждения ГАМК-рецепторов, с одной стороны, и облегчения синаптического проведения — с другой [21]. Кроме того, 20Е ограничивает повреждающее действие возбуждающего нейромедиатора глутамата на адренергические нейроны [21]. Серпистен обладает выраженным тонизирующим эффектом на ЦНС, который проявлялся в ускорении ориентировочно-исследовательской реакции и стимуляции памяти у животных [18].

### Заключение

На основании полученных нами результатов и данных литературы можно утверждать, что действие ФЭС, в том числе и Серпистена, реализуется через центральные механизмы формирования стресс-реакции и стресс-устойчивости. По нашему мнению, перестройка регуляторных механизмов связана с активацией синтоксических (сдерживающих стресс) механизмов с переключением энергетической компоненты на белковый синтез (как в центральных, так и исполнительных органах) с

последующим формированием систем с более мощной энергетической емкостью и высокими функциональными резервами.

*Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН № 21 «Фундаментальные науки — медицине» (проект № 09-П-4-1013: «Молекулярно-клеточные механизмы стресс-устойчивости и оценка возможности фитотерапевтической коррекции адаптивных реакций организма в неблагоприятных условиях окружающей среды, высоких физических и психо-эмоциональных нагрузок»).*

### Литература

1. Васильев А.С., Плотников М.Б., Алиев О.И. и др. Гемореологическая активность экстракта из надземной части *Serratula coronata* (Asteractae) // Растительные ресурсы. — 2008. — № 1. — С. 104–109.
2. Володин В.В., Володина С.О. Патент № 2153346, Российская Федерация, МКИЗ А61К 35/78. Способ получения экдистероидов. Институт биологии Коми НЦ УрО РАН; № 99106351/14.Э; заявл. 29.03.99; опубл. 27.07.2000. Бюл. № 21.
3. Длусская И.С., Стрюк Р.И. Новый метод прогнозирования и оценки эффективности  $\beta$ -адреноблокаторов у больных гипертонической болезнью // Кардиология. — 1997. — № 8. — С. 110–130.
4. Карасева Ю.В., Морозов В.Н., Хадарцев А.А. и др. Фитоэкдистерон и синтоксические программы адаптации / Эколого-физиологические проблемы адаптации: Матер. XI междунар. симпоз. — М., 2003. — С. 229–231.
5. Лабораторные методы исследования / Под ред. В.В. Меньшикова. — М., 1987. — 369 с.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. школа, 1990. — 340 с.
7. Лютоева Т.А., Петрова Н.Б. Адренореактивность организма человека на Севере / Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике: Матер. IX молодеж. науч. конф. ИФ Коми НЦ УрО РАН. — Сыктывкар, 2010. — С. 95–97.
8. Манухин Б.Н., Нестерова Л.А., Смурова Е.А. Характеристика кинетики взаимодействия бета-адренорецепторов эритроцитов крыс со специфическим блокатором пропранололом // Биол. мембраны. — 1994. — Т. 11. — № 5. — С. 489–491.
9. Маслова М.И. Активность мембранных ферментов при различных стрессорных воздействиях // Физиол. журн. — 1994. — Т. 80. — № 7. — С. 76–79.
10. Мойсенко Н.А., Иржак Л.И. Агглютинация эритроцитов кролика при напряженном эритропоэзе // Журн. общ. биол. — 1972. — Т. 33. — № 6. — С. 779.

11. *Мойсенко Н.А., Петрова Н.Б., Иванкова Н.Б., Репина Е.Н.* Гематопротекторное и антистрессорное действие препаратов фитостероидов «Серпистен» из растений *Serratula coronata* L. / *Материалы XX съезда физиологического общества им. И.П. Павлова.* — М., 2007. — С. 339
12. *Мойсенко Н.А., Петрова Н.Б., Иванова Ж.Е., Репина Е.Н.* Действие фитостероидов на количественные и качественные показатели крови млекопитающих в норме и при экспериментальных воздействиях // *Вестн. СГУ. Сер. Физика. Химия. Биология.* — 2006. — Вып. 1. — С. 22–137.
13. *Панасян А., Амбарцумян М., Ованесян А., Викман Г.* Адаптогены модифицируют ответ на стресс в результате угнетения увеличения протеинкиназы (P-SARK), оксида азота и кортизона в крови кроликов / *Фитофарм 2006: Матер. X междунар. съезда.* — СПб., 2006. — С. 505–506.
14. *Петрова Н.Б., Канева А.М., Рау И.В., Изъюрова Е.В.* Адренореактивность эритроцитов человека и животных при различных воздействиях. / *Физиологические механизмы природных адаптаций: Матер. докл. III междунар. симпоз.* — Иваново, 1999. — С. 123–124.
15. *Петрова Н.Б., Мойсенко Н.А., Володин В.В.* Патент № 2310196, Российская Федерация, МПК6 G01N 33/48. Способ определения функциональной активности симпато-адреналовой системы. ИБ Коми НЦ УрО РАН; № 2005141251/15; заявл. 28.12.2005; опубл. 10.11.2007. Бюл. № 31.
16. *Раскоша О.В., Ермакова О.В., Селезнева А.В., Стрелковская О.В.* Состояние периферических эндокринных желез белых беспородных мышей после воздействия экдистероидов серпухи венценосной // *Вестн. ИБ Коми НЦ УрО РАН.* — 2007. — № 2. — С. 33–35.
17. *Скурихин Е.Г., Суслов Н.И., Провалова Н.В.* Адренергические механизмы влияния препаратов природного происхождения на систему крови в условиях иммобилизационного стресса / *Поиск, разработка и внедрение новых лекарственных средств и организационных форм фармацевтической деятельности: Матер. междунар. науч. конф.* — Томск, 2000. — С. 186–187.
18. *Фитостероиды* / Под ред. В.В. Володина. — СПб.: Наука, 2003. — 293 с.
19. *Шишкина Г.Т., Дыгало Н.Н.* Молекулярная физиология адренергических рецепторов // *Усп. физиол. наук.* — 1997. — Т. 28. — № 1. — С. 61–70.
20. *Panossian 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.
21. *Tsujiyama S., Mishima H.K., Shoge K. et al.* Existence of inotropic glutamate receptor subtypes in cultured rat retinal ganglion cells obtained by the magnetic cell sorter method and inhibitory effect of 20-hydroxyecdysone, a neurosteroid, on the glutamate response // *Jap. J. Pharmacol.* — 2002. — Vol. 89. — P. 44–52.
22. *Tsujiyama S., Ujihara H., Ishihara K., Sasa M.* Potentiation of GABA-induced inhibition by 20-hydroxyecdysone, a neurosteroid, in cultured rat cortical neurons // *Jap. J. Pharmacol.* — 1995. — Vol. 68. — P. 133–136.

## ANTI-AGGREGATION AND STRESS-LIMITATION EFFECT OF ECDYSTEROID CONTAINING PREPARATION SERPISTEN

N.B. PETROVA<sup>1</sup>, V.V. VOLODIN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Syktvkar State University,*

<sup>2</sup> *Institute of Biology, Komi Science Centre, Ural Branch, RAS, Syktvkar, Russia*

Effects of ecdysteroid containing preparation Serpisten and prednisolone on erythrocytes agglutinability and adrenoreactivity and also condition of sympatho-adrenal system dormantly and in the state of immobilization stress are studied. In comparison with prednisolone Serpisten promotes preservation of the original level of adrenoreactivity of erythrocytes and prevents excessive activation of sympatho-adrenal system when they were introduced in rats 24 hours prior to immobilization. In humans, a 2-week course of nutritional supplement Serpisten leads to stimulation of erythropoiesis and reduction of desensitization of the cell membrane to the action of catecholamines. In both cases stress response is reduced.

*Keywords:* sympatho-adrenal system, adrenoreactivity, erythrocyte agglutinability reaction, phytoecdysteroids, Serpisten.

# НОВАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ МЕТИЛЗАВИСИМАЯ ДНК-ЭНДОНУКЛЕАЗА P<sub>krI</sub> УЗНАЕТ И РАСЩЕПЛЯЕТ МЕТИЛИРОВАННУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК 5'-GCN<sup>^</sup>GC-3'/3'-CG<sup>^</sup>NCG-5', СОДЕРЖАЩУЮ НЕ МЕНЕЕ ТРЕХ 5-МЕТИЛЦИТОЗИНОВ

В.А. ЧЕРНУХИН\*, Т.Н. НАЯКШИНА, Д.А. ГОНЧАР, Ю.Э. ТОМИЛОВА, М.В. ТАРАСОВА, В.С. ДЕДКОВ, Н.А. МИХНЕНКОВА, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Из штамма бактерии *Planomicrobium koreense* 78k выделена новая сайт-специфическая метилзависимая ДНК-эндонуклеаза P<sub>krI</sub>, узнающая и расщепляющая, как указано стрелкой, метилированную последовательность ДНК 5'-GCN<sup>^</sup>GC-3'/3'-CG<sup>^</sup>NCG-5' при наличии в ней не менее трех 5-метилцитозинонов и не расщепляющая неметилированную ДНК. Благодаря своей способности расщеплять только метилированную ДНК фермент P<sub>krI</sub> может найти практическое применение в молекулярно-биологических работах, в частности, для определения статуса метилирования ДНК эукариот.

**Ключевые слова:** сайт-специфические метилзависимые ДНК-эндонуклеазы, метилированная ДНК.

## Введение

Наиболее изученными сайт-специфическими эндонуклеазами являются эндонуклеазы рестрикции типа II (рестриктазы), которые входят в так называемые бактериальные системы рестрикции-модификации, содержащие еще ДНК-метилтрансферазы. Рестриктаза расщепляет чужую ДНК по определенному сайту, а ДНК-метилтрансфераза метилирует эту же последовательность в бактериальной ДНК, предотвращая таким образом ее гидролиз собственной эндонуклеазой рестрикции.

К эндонуклеазам рестрикции близки по свойствам метилзависимые сайт-специфические эндонуклеазы, которые расщепляют только метилированную ДНК. Сравнительно недавно обнаруженные сайт-специфические 5-метилцитозинзависимые ДНК-эндонуклеазы узнают и расщепляют определенные последовательности ДНК, содержащие 5-метилцитозин, не требуют кофакторов помимо ионов Mg<sup>2+</sup> и гидролизуют субстрат полностью и в тех же условиях, что и эндонуклеазы рестрикции [7].

Наиболее разнообразной оказалась группа метилзависимых эндонуклеаз, которая узнает различные варианты метилированной последовательности 5'-GCNCG-3'/3'-CGNCG-5'. К этой группе относятся описанные ранее ферменты B<sub>lsI</sub> [3], B<sub>isI</sub> [5], и G<sub>luI</sub> [4], которые отличаются друг от друга как местом расщепления ДНК, так и узором метилирования, необходимым для эффективного гидролиза.

В данной работе изучена субстратная специфичность новой сайт-специфической метилзависимой ДНК-эндонуклеазы P<sub>krI</sub>, узнающей и расщепляющей, как указано стрелкой, метилированную последовательность ДНК 5'-GCN<sup>^</sup>GC-3'/3'-CG<sup>^</sup>NCG-5' при наличии в ней не менее трех 5-метилцитозинонов.

## Материалы и методы

**Реактивы.** В работе использовали следующие реактивы и компоненты питательных сред: Tris («Promega», США); акриламид, бис-акриламид, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, ампициллин («Helicon», Россия); ЭДТА («Fluka AG» Швейцария), агароза («Hybaid-AGS», Германия), тритон X-100 («ICN», США), лизоцим («Serva», Германия), дифенилметилсульфонилфторид (PSMF) («Sigma», США), фосфоцеллюлоза P-11 («Whatman», Англия), гепарин-сефароза («BioRad», США), триптон, дрожжевой экстракт («Organotechnie», Франция), ферменты и препараты ДНК (НПО «СибЭнзим»). Остальные реактивы — отечественного производства квалификации х.ч.

© 2011 г. Чернухин В.А., Наякшина Т.Н., Гончар Д.А., Томилова Ю.Э., Тарасова М.В., Дедков В.С., Михненкова Н.А., Дегтярев С.Х.

\* **Автор для переписки:**

Чернухин Валерий Алексеевич

НПО «СибЭнзим»

630117 Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2/12

Для проведения реакции гидролиза эндонуклеазой P<sub>kl</sub>I использовали SE-буфер «В» («СибЭнзим», Россия) следующего состава: 10 мМ Трис-НСl, рН 7,6; 10 мМ MgCl<sub>2</sub>; 1 мМ дитиотрейтол.

**Выращивание штамма-продуцента.** Выращивание штамма проводили в ферментере 1601-013 (LKB, Швеция) при температуре 30 °С в 20 л питательной среды, содержащей 1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 0,5% NaCl и 0,05% MgCl<sub>2</sub>, при рН 7,5 с аэрацией 10 л/мин. и перемешиванием 200 об./мин. При достижении культурой поздней логарифмической стадии роста клетки осаждали с помощью центрифугирования при 5000 об./мин. при 4 °С. В результате получили 100 г биомассы, которую хранили при -20 °С.

**Выделение фермента. Условия проведения выделения и используемые буферы.** Выделение проводилось при 4 °С с использованием растворов:

- буфер А — 10 мМ Трис-НСl рН 7,6, 0,1 мМ ЭДТА и 7 мМ 2-меркаптоэтанол;
- буфер В — 10 мМ К-фосфат рН 7,2, 0,1 мМ ЭДТА и 7 мМ 2-меркаптоэтанол;
- буфер С — 60 мМ Трис-НСl рН 7,6, 0,1 мМ ЭДТА и 7 мМ 2-меркаптоэтанол.

Тестирование активности фермента при очистке проводилось в 20 мкл реакционной смеси в SE-буфере «В» при 37 °С, содержащем 0,5 мкг ДНК рFsp4HI2/DriI [4].

Предварительный подбор оптимальных для P<sub>kl</sub>I условий (SE-буфер «В» при 37 °С) установили на основе сравнения глубины гидролиза в различных SE-буферах и температурах на ДНК рFsp4HI2/DriI.

**Экстрагирование.** 15 г биомассы суспендировали в 45 мл буфера А с 0,3 М NaCl, 1 мМ фенилметилсульфонилфторида, 0,1 мг/мл лизоцима, 0,1% Тритоном X-100. Клетки разрушали ультразвуком на Soniprep 150 («MSE», Англия) с диаметром адаптера 2 см. Обработка проводилась при амплитуде 20 мкм 7 раз по 1 мин. с интервалами по 1 мин. с охлаждением суспензии в ледяной бане. Экстракт осветляли центрифугированием при 15000 об./мин. 30 мин. в роторе JA-20 на центрифуге J-2-21 («Beckman», США).

**Хроматография на фосфоцеллюлозе.** Экстракт наносили на колонку объемом 45 мл, уравновешенную в буфере А с 0,2 М NaCl и промывали двумя колоночными объемами буфера А с 0,2 М NaCl. Белок, не связавшийся со смолой и содержащий целевую активность, осаждали 70% сульфатом аммония, центрифугировали при 12000 об./мин. 30 мин. в роторе JA-14 на центрифуге J-2-21.

**Гель-фильтрация.** Осадок растворяли в буфере А, наслаивали на колонку с биогеелем А-0,5m объемом 500 мл и промывали буфером А с 0,8М NaCl, 0,1% Тритоном X-100 со скоростью 40 мл/ч. Фракции, содержащие целевую активность, объединяли.

**Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе.** Объединенные фракции диализовали против 4 л буфера А в течение 3 ч, наносили на колонку ДЭАЭ-целлюлозы объемом 50 мл, уравновешенную в буфере А с 0,05 М NaCl, и промывали двумя объемами буфера А с 0,05 М NaCl. Белок элюировали линейным градиентом NaCl от 0,075 М до 0,45 М объемом 400 мл. Фракции, содержащие целевую активность, объединяли.

**Хроматография на фенил-сефарозе.** К объединенным фракциям добавляли Tris-НСl рН 7,6 до концентрации 60 мМ, сульфат аммония — до концентрации 1,7 М, наносили на колонку фенил-сефарозы объемом 4 мл, уравновешенную в буфере С с 1,7 М сульфата аммония, и промывали двумя объемами 1,7 М сульфата аммония в буфере С. Белок элюировали линейным градиентом сульфата аммония от 1,7 до 0 М в буфере С объемом 240 мл. Фракции, содержащие целевую активность, объединяли.

**Хроматография на гидроксилапатите (ГАП).** Объединенные фракции диализовали против 2,5 л буфера А в течение 16 ч, наносили на колонку ГАП объемом 4 мл, уравновешенную в буфере В, и промывали двумя объемами буфера В. Белок элюировали линейным градиентом К-фосфатного буфера рН 7,2 от 0,01 до 0,2 М объемом 160 мл. Фракции, содержащие целевую активность, объединяли.

**Рехроматография на фенил-сефарозе.** К объединенным фракциям добавляли Tris-НСl рН 7,6 до концентрации 60 мМ и сульфат аммония — до концентрации 1,7 М, затем наносили на колонку фенил-сефарозы объемом 4 мл, уравновешенную в буфере С с 1,7 М сульфата аммония, и промывали двумя объемами 1,7 М сульфата аммония в буфере С. Белок элюировали линейным градиентом сульфата аммония от 1,7 до 0 М в буфере С объемом 200 мл. Фракции, содержащие целевую активность, объединяли.

**Хроматография на гепарин-сефарозе.** Объединенные фракции диализовали против 1,5 л буфера А в течение 16 ч, наносили на колонку гепарин-сефарозы объемом 4 мл, уравновешенную в буфере А с 0,1 М NaCl, и промывали двумя объемами 0,1 М NaCl в буфере А. Белок элюировали линейным градиентом NaCl от 0,1 до 0,7 М объемом 160 мл. Фракции, содержащие целевую активность, объединяли.

### Концентрирование и хранение препарата.

Объединенные фракции диализовали в течение 20 ч против 300 мл буфера А с 55% глицерином, 0,25 М NaCl и хранили при -20 °С.

**Определение активности фермента.** Для определения активности фермента P<sub>ck</sub>I использовалась плаزمида pF<sub>sp</sub>4H12, предварительно линейризованная рестриктазой D<sub>ri</sub>I. За одну единицу активности сайт-специфической эндонуклеазы P<sub>ck</sub>I принималось минимальное количество фермента, при котором происходит полный гидролиз 1 мкг ДНК плазмиды pF<sub>sp</sub>4H12, предварительно линейризованной рестриктазой D<sub>ri</sub>I, в 50 мкл реакционной смеси в оптимальных условиях: при 37 °С в SE-буфере «В».

**Определение места гидролиза ДНК и сайта узнавания на олигонуклеотидных дуплексах.** Позиции

D1: 5'-GAGTTTAG(m5C)GG(m5C)TATCGATCC-3'  
 D2: 5'-GGATCGATAG(m5C)CG(m5)CTAAACTC-3'  
 NN01 5'-GCTTGTACTTTAGCGGCATTGATTCTCACCACG-3'  
 NN02 5'-GCTTGTACTTTAGCGGCATTGATTCTCACCACG-3'  
 NN1 5'-GCTTGTACTTTAG(m5C)GGCATTGATTCTCACCACG-3'  
 NN2 5'-CGTGGTGAGAATCAATG(m5C)CGCTAAAGTACAAGC  
 DD1 5'-GCTTGTACTTTAG(m5C)GG(m5C)ATTGATTCTCACCACG-3'  
 DD2 5'-CGTGGTGAGAATCAATG(m5C)CG(m5C)TAAAGTACAAGC-3'  
 NN11 5'-GCTTGTACTTTAGCGG(m5C)ATTGATTCTCACCACG-3'  
 NN22 5'-CGTGGTGAGAATCAATGCCG(m5C)TAAAGTACAAGC-3'

Все олигонуклеотиды с четными номерами комплементарны олигонуклеотидам с нечетными номерами.

Определение первичной структуры фрагмента гена 16S РНК штамма *Planomicrobium koreense* 78к проводили путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) на ДНК штамма со следующих праймеров:

16S-direct 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCA-3'  
 16S-reverse 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'

Первичная структура фрагмента гена 16S РНК определялась с помощью секвенатора 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### Результаты и обсуждение

**Описание штамма-продуцента и его таксономическая идентификация.** В ходе скрининга нами был обнаружен бактериальный штамм-продуцент новой ДНК-эндонуклеазы. Клетки штамма продуцента представляют собой грамположительные кокки, 1 мкм в диаметре, располагаются одиночно, в парах, тетрадах, неподвижные. Факультативные анаэробы. Каталазоположительные. Растут при температуре от +4 до +40 °С.

гидролиза ДНК сайт-специфической эндонуклеазой P<sub>ck</sub>I были установлены путем сравнения длин фрагментов, образующихся при расщеплении <sup>32</sup>P-меченного олигонуклеотидного дуплекса эндонуклеазами P<sub>ck</sub>I и B<sub>ls</sub>I. В качестве маркера длин фрагментов использовали продукты частичного расщепления этого же дуплекса экзонуклеазой III из *E. coli* (E<sub>co</sub>III). Расщепление ДНК проводили в оптимальных условиях в течение 1 часа. Фрагменты ДНК, образующиеся в результате расщепления олигонуклеотидного дуплекса, разделяли электрофорезом в денатурирующем 20% полиакриламидном геле (ПААГ) с 7 М мочевиной.

Определение субстратной специфичности проводили путем расщепления олигонуклеотидных дуплексов, полученных из следующих олигонуклеотидов, синтезированных в НПО «СибЭнзим» (Россия):

При встряхивании в питательном бульоне LB образуют гомогенную муть. На питательном агаре при +24 °С через 4 суток образуют колонии размером около 1 мм, гладкие, блестящие, непрозрачные, розоватого оттенка. Содержание G+C в ДНК, равное 52–58%, определили по методу [1].

Установленная структура фрагмента гена 16S РНК представлена ниже:

1 ccatcatctg tccaacctc ggcggctggc tccaagaagg ttacctcacc gacttcgggt  
 61 gttacaacc ctctgtgtgt gacggcggt gtgacaagg cccgggaacg tattcacctg  
 121 ggcatgctga tccagatta ctacgattc cggcttcag caggcgagtt gcagcctgca  
 181 atccgaactg agaacggitt tctgggattg gctccccctc gcgggtttgc agccctttgt  
 241 accgtccatt gtagcacgtg ttagcccag gtcataaagg gcatgatgat ttgactgat  
 301 cccacctc ctccggttg tcaccggcag tcacctaga gtgcccaact gaatgctggc  
 361 aactaagatc aagggttgcg ctcttgccg gacttaacc aactctcac gacacgagct  
 421 gacgacaacc atgaccacc tgtaccgct gtcccgaag ggaagacctc gctcctgag  
 481 cggcgacgg gatgtaaga cctgtaagg ttcttcgctg tctctgaat taaccacat  
 541 gctccaccg tctgctgggc cccctcaat tccttgagt ttacgcttg cggcctgact  
 601 ccccgaggc agtgcttaat gcgttagctg cagcactaag gggcggaacc ccctaacac  
 661 ttgactca tctttaccg cgtggactac cagggtatc aatctgttt gctccccag  
 721 ctcttcgcc tcagcgtcag ttacagacca gaaagtcgcc ttcgccactg gttctctcc  
 781 acatctctac gctttacc gctacacgtg gaattccact ttctctct gactcaagt  
 841 ccccgagtt ccaatgacc tccaggttga gccgtgggct ttacatcag acttaaggga  
 901 cgcctgcgc gctcttaca cccaataat cgggacaacg ctggcacct

По определителю [2], а также с помощью анализа по программе BLAST полученной структуры фрагмента 16S РНК [6] штамм был определен как *Microbacterium testaceum* 17В. Продуцируемая данным штаммом новая ДНК-эндонуклеаза названа PkrI по номенклатуре [9].

**Получение препарата фермента PkrI и определение его субстратной специфичности.** Фермент PkrI выделяли из клеточного экстракта путем последовательных хроматографических процедур, как описано в разделе «Материалы и методы». Выход фермента из 15 грамм биомассы составил 3 мл препарата.

Измерение активности фермента проводили в предварительно подобранном оптимальном SE-буфере «В» при установленной оптимальной температуре 37 °С.

Определение активности фермента PkrI проводили, расщепляя плазмиду pFsp4HI2, линейризованную рестриктазой DriI, путем последовательного разведения препарата фермента в два раза. За единицу активности PkrI принимали количество фермента, необходимое для полного исчезновения линейной формы 1 мкг плазмиды pFsp4HI2/DriI за 1 час при 37 °С в SE-буфере «В» в 50 мкл реакционной смеси.

На рисунке 1 приведены результаты определения активности. Концентрация полученного препарата PkrI составляет 2000 ед./мл.

Определение субстратной специфичности фермента проводили с использованием различных плазмидных и фаговых ДНК: ДНК фагов λ и Т7, плазмиды pHspAI1 (содержит метилированные последовательности 5'-G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G-5' [7]) и плазмиды pFsp4HI2, которая несет ген метилазы M.Fsp4HI, метилирующей первый цитозин в последовательности 5'-GCNGC-3', и содержит метилированные последовательности 5'-G(5mC)NGC-3'/3'-CGN(5mC)G-5' [4].

На рисунке 2 представлена электрофореграмма продуктов, образованных в результате обработки ДНК фагов лямбда и Т7, а также плазмид pHspAI и pFsp4HI2 эндонуклеазой PkrI. Как видно из этого рисунка, PkrI не расщепляет ДНК фагов лямбда и Т7, а также ДНК pHspAI, содержащую метилированные последовательности 5'-GCCG-3'. При этом PkrI расщепляет ДНК pFsp4HI2, давая хорошо видимый фрагмент в районе 450–500 п.н. (дорожка 11).

Анализ первичной структуры плазмиды показал, что в pFsp4HI2 имеются две последовательности 5'-GCNGCNGC-3', расположенные друг от друга на расстоянии 484 п.н.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

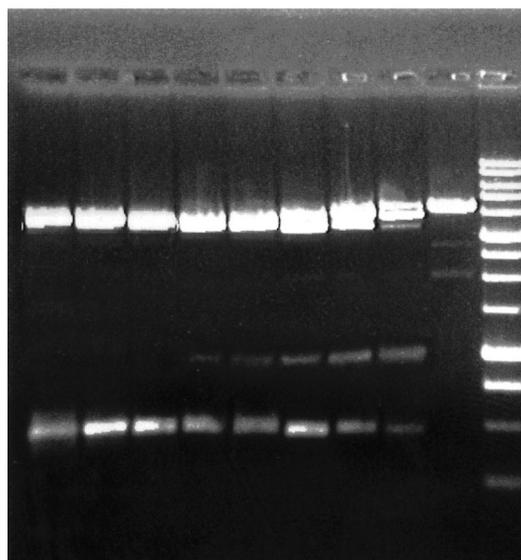


Рис. 1. Активность фермента PkrI на ДНК pFsp4HI2/DriI. Электрофорез в 1% агарозном геле. Время реакции 1 час. Объем реакционной смеси — 50 мкл.

Дорожки:

- 1 — 2 мкл препарата PkrI;
- 2 — 1 мкл препарата PkrI;
- 3 — 1/2 мкл препарата PkrI;
- 4 — 1/4 мкл препарата PkrI;
- 5 — 1/8 мкл препарата PkrI;
- 6 — 1/16 мкл препарата PkrI;
- 7 — 1/32 мкл препарата PkrI;
- 8 — 1/64 мкл препарата PkrI;
- 9 — ДНК, не обработанная ферментом;
- 10 — маркер молекулярных масс ДНК 1 kb («СибЭнзим», Россия)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

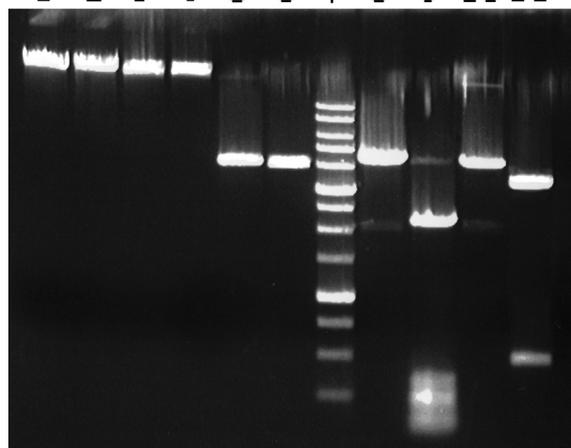


Рис. 2. Анализ специфичности эндонуклеазы PkrI на метилированной и неметилированной ДНК. Электрофорез в 1% агарозном геле.

Дорожки:

- 1 – ДНК фага лямбда;
- 2 – ДНК фага лямбда, обработанная P<sub>kr</sub>I;
- 3 – ДНК фага T7;
- 4 – ДНК фага T7, обработанная P<sub>kr</sub>I;
- 5 – ДНК pHspAI/GsaI;
- 6 – ДНК pHspAI/GsaI, обработанная P<sub>kr</sub>I;
- 7 – маркер молекулярной массы ДНК 1 kb («СибЭн-займ», Россия);
- 8 – pFsp4HI2/DriI;
- 9 – pFsp4HI2/DriI, обработанная B<sub>l</sub>sI;
- 10 – pFsp4HI2/DriI, обработанная GluI;
- 11 – pFsp4HI2/DriI, обработанная P<sub>kr</sub>I.

Последовательность 5'-GCNGCNGC-3' представляет собой два перекрывающихся сайта узнавания метилазы M.Fsp4HI. При этом, если метилированная последовательность 5'-GCNGC-3' содержит два 5-метилцитозина в обеих цепях сайта узнавания, то последовательность 5'-GCNGCNGC-3' метилируется с образованием сайта 5'-G(5mC)NG(5mC)NGC-3'/3'-CGN(5mC)GN(5mC)G-5'. Этот сайт представляет собой две перекрывающиеся метилированные последовательности 5'-GCNGC-3' с тремя 5-метилцитозинами.

Полученный в эксперименте фрагмент ДНК размерами 450–500 п.н. (рис. 2, дорожка 11) соответствует фрагменту 485 п.н., получаемому при расщеплении pFsp4HI2 по метилированным последовательностям 5'-GCNGCNGC-3'. Этот результат дает основание предположить, что P<sub>kr</sub>I узнает и расщепляет метилированную последовательность 5'-GCNGC-3', содержащую три 5-метилцитозина. Как видно из рисунка 2, B<sub>l</sub>sI, в отличие от P<sub>kr</sub>I, эффективно расщепляет все метилированные последовательности 5'-GCNGC-3 с двумя 5-метилцитозинами в обеих цепях (дорожка 9). В то же время эндонуклеаза GluI не расщепляет последовательности 5'-GCNGC-3' как с двумя, так и с тремя 5-метилцитозинами (дорожка 10).

На рисунке 3 представлена электрофореграмма продуктов, образованных в результате гидролиза ДНК pUC19 эндонуклеазой рестрикции Fsp4HI, а также pUC19, предварительно метилированной метилазой CviPI и обработанной затем эндонуклеазой P<sub>kr</sub>I. ДНК-метилтрансфераза CviPI метилирует цитозин в динуклеотидной последовательности 5'-GC-3'[8].

Как видно из рисунка 3, электрофоретические подвижности фрагментов, образованных при гидролизе pUC19 рестриктазой Fsp4HI (сайт узнавания 5'-GCNGC-3') и при гидролизе эндонуклеазой P<sub>kr</sub>I плазмиды pUC19, предварительно метилированной по последовательности 5'-GC-3', совпадают.

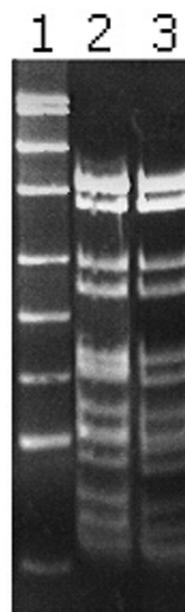


Рис. 3. Сайт-специфическое расщепление эндонуклеазой P<sub>kr</sub>I ДНК плазмиды pUC19, предварительно метилированной M.CviPI по динуклеотиду GC. Электрофорез в 15% полиакриамидном геле в буфере TAE.

Дорожки:

- 1 – pUC19, гидролизованная эндонуклеазой рестрикции MspI по сайту 5'-CCGG-3', использованная в качестве маркера молекулярных масс;
- 2 – pUC19, гидролизованная эндонуклеазой рестрикции Fsp4HI по сайту 5'-GCNGC-3';
- 3 – pUC19, предварительно метилированная метилазой CviPI и обработанная эндонуклеазой P<sub>kr</sub>I

Поскольку при метилировании ферментом M.CviPI все сайты 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5' превращаются в последовательности 5'-G(5mC)NG(5mC)-3'/3'(5mC)GN(5mC)G-5', то можно заключить, что P<sub>kr</sub>I расщепляет полностью метилированный сайт 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5', содержащий четыре 5-метилцитозина.

Следовательно, из результатов, представленных на рисунках 2 и 3, можно заключить, что сайт-специфическая эндонуклеаза ДНК P<sub>kr</sub>I узнает и расщепляет метилированную последовательность 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5' при наличии в ней не менее трех 5-метилцитозинов.

По субстратной специфичности ДНК-эндонуклеаза P<sub>kr</sub>I наиболее близка к ранее описанным сайт-специфическим метилзависимым ДНК-эндонуклеазам B<sub>l</sub>sI и GluI. Все три фермента расщепляют метилированную последовательность 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5', однако отличаются по узнаваемому узору

метилирования. В отличие от *CluI*, расщепляющей полностью метилированный сайт, *PkrI* способна эффективно гидролизовать последовательность 5'-GCNCG-3'/3'-CGNCG-5' при наличии в ней трех 5-метилцитозинов. В то же время *PkrI*, в отличие от *BlsI*, не способна расщеплять последовательность 5'-GCNCG-3' при наличии в ней двух 5-метилцитозинов.

**Определение позиции гидролиза ДНК ферментом *PkrI*.** Определение места гидролиза ДНК-эндонуклеазой *PkrI* осуществляли путем сравнения длин фрагментов, образуемых при расщеплении эндонуклеазой *PkrI* и *BlsI* олигонуклеотидного дуплекса D1/D2 (см. структуру в разделе «Материалы и методы»). В качестве маркера длин фрагментов использовали продукты частичного расщепления этих же дуплексов экзонуклеазой *EcoIII* из *E. coli*.

На рисунке 4 представлен радиоавтограф электрофореграммы продуктов расщепления олигонуклеотидного радиоактивно меченного дуплекса D1/D2 в 20% полиакриламидном геле, содержащем 7 М мочевиной.

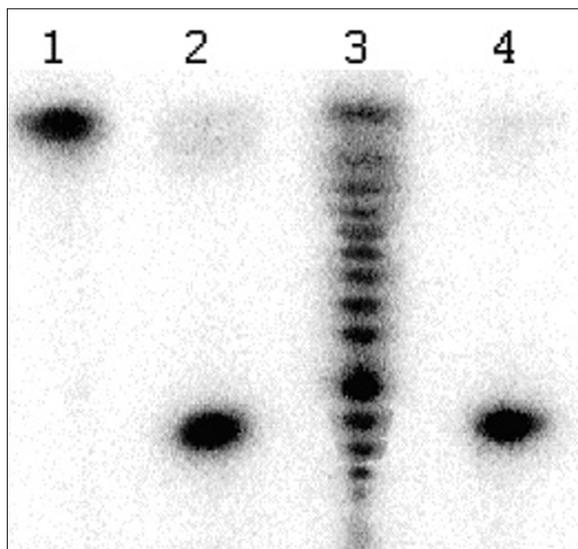


Рис. 4. Определение позиции гидролиза ДНК ферментом *PkrI*. Электрофорез в 20% ПААГ с 7 М мочевиной.

Дорожки:

- 1 – исходный дуплекс D1\*/D2;
- 2 – дуплекс D1\*/D2, обработанный эндонуклеазой *H78*;
- 3 – дуплекс D1\*/D2, обработанный экзонуклеазой III из *E. coli*;
- 4 – дуплекс D1\*/D2, обработанный эндонуклеазой *BlsI*.

Символом «\*» отмечены олигонуклеотиды, меченные радиоактивным фосфором  $^{32}\text{P}$  по 5'-концу

Из этого рисунка 4 видно, что продукты гидролиза ДНК дуплекса D1\*/D2 на дорожках 2 и 4 имеют одинаковые длины. Это означает, что позиции гидролиза ДНК ферментами *PkrI* и *BlsI* совпадают.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что *PkrI* узнает и расщепляет метилированную последовательность ДНК 5'-GCNCG-3' после центрального нуклеотида при наличии в этой последовательности не менее трех 5-метилцитозинов.

**Изучение субстратной специфичности *PkrI*.** Для изучения субстратной специфичности *PkrI* олигонуклеотиды были гидролизованы с метилированной последовательностью 5'-GCNCG-3'/3'-CGNCG-5', содержащей различные комбинации 5-метилцитозинов. На рисунке 5 представлены полученные результаты. Как следует из приведенного рисунка, *PkrI* не расщепляет неметилированную последовательность 5'-GCNCG-3'/3'-CGNCG-5' (дорожка 2), метилированную последовательность 5'-GCNCG-3'/3'-CGNCG-5' с двумя 5-метилцитозинами при любых возможных сочетаниях последних: двух внутренних – 5'-G(5mC)NGC-3'/3'-CGN(5mC)G-5' (дорожка 4); двух внешних – 5'-GCNG(5mC)-3'/3'-(5mC)GNCG-5' (дорожка 6); одного внутреннего, одного внешнего на разных цепях – 5'-G(5mC)NGC-3'/3'-(5mC)GNCG-5' (дорожка 8) и, наконец, одного внутреннего и одного внешнего на одной цепи – 5'-G(5mC)NG(5mC)-3'/3'-CGNCG-5' (дорожка 10).

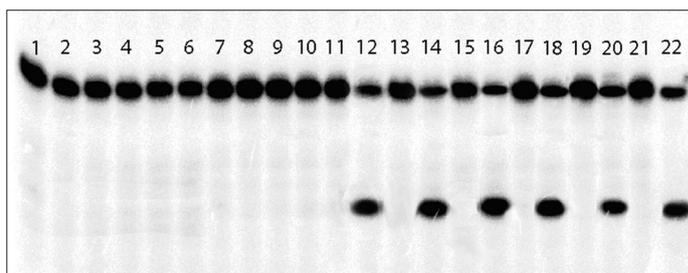


Рис. 5. Анализ специфичности фермента *PkrI* на меченых  $^{32}\text{P}$  синтетических олигонуклеотидных дуплексах. Электрофорез в 20% ПААГ с 7 М мочевиной.

Дорожки:

- 1 – NN01\*/NN02;
- 2 – NN01\*/NN02, обработанный *PkrI*;
- 3 – NN1\*/NN2;
- 4 – NN1\*/NN2, обработанный *PkrI*;
- 5 – NN11\*/NN22;
- 6 – NN11\*/NN22, обработанный *PkrI*;
- 7 – NN1\*/NN22;
- 8 – NN1\*/NN22, обработанный *PkrI*;
- 9 – DD1\*/NN02;

- 10 – DD1\*/NN02, обработанный PkrI;
- 11 – DD1\*/DD2;
- 12 – DD1\*/DD2, обработанный PkrI;
- 13 – DD2\*/DD1;
- 14 – DD2\*/DD1, обработанный PkrI;
- 15 – DD1\*/NN1;
- 16 – DD1\*/NN1, обработанный PkrI;
- 17 – NN1\*/DD1;
- 18 – NN1\*/DD1, обработанный PkrI;
- 19 – DD1\*/NN22;
- 20 – DD1\*/NN22, обработанный PkrI;
- 21 – NN22\*/DD1;
- 22 – NN22\*/DD1, обработанный PkrI.

При этом PkrI расщепляет последовательность 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5' при наличии трех 5-метилцитозин в обоих вариантах: при наличии двух внутренних и одного внешнего 5-метилцитозина – 5'-G(5mC)NG(5mC)-3'/3'-CGN(5mC)G-5' (дорожки 16, 18), а также двух внешних и одного внутреннего – 5'-G(5mC)NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GNCG-5' (дорожки 20, 22). Кроме того, PkrI гидролизует полностью метилированный сайт 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5' с четырьмя 5-метилцитозинами (дорожки 12, 14).

### Заключение

Таким образом, сайт-специфическая метилзависимая ДНК-эндонуклеаза PkrI узнает и расщепляет перед вторым остатком гуанина метилированную последовательность 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5' при наличии в ней не менее трех 5-метилцитозин.

Сравнение свойств известных на сегодня сайт-специфических метилзависимых ДНК-эндонуклеаз показывает, что узнавая одну и ту же базовую последовательность ДНК, ферменты могут существенно различаться по требуемому узору метилирования. При одинаковой неметилированной последовательности 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5' для гидролиза ее модифицированных вариантов требуется наличие двух метилцитозин в случае BlnI и BspI, не менее трех – для PkrI и четырех – для GluI.

Остается открытым вопрос о том, какую биологическую роль играют сайт-специфические метилзависимые ДНК-эндонуклеазы в жизнедеятельности бактериальной клетки и какое значение имеет варьирование узора метилирования в сайтах узнавания различных метилзависимых ДНК-эндонуклеаз.

Фермент PkrI может быть использован для выявления и анализа метилированной ДНК. В частности,

поскольку узнаваемая последовательность содержит метилированную CG-пару, PkrI может применяться для анализа CG-метилированной ДНК млекопитающих.

*Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по государственному контракту, заключенному в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы».*

### Литература

1. Дедков В.С. Определение содержания G+C в ДНК бактерий при помощи эндонуклеаз рестрикции // Биотехнология. – 2004. – № 4. – С. 77–82.
2. Определитель бактерий Берджи. / Под ред. Дж. Хоулта и др.: (9-е издание в 2 томах): Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина. – М., 1997.
3. Чернухин В.А., Томилова Ю.Э., Чмуж Е.В., Соколова О.О., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Сайт-специфическая эндонуклеаза BlnI узнает последовательности ДНК 5'-G(5mC)NGC-3' и расщепляет ее с образованием 3'-выступающих концов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2007. – Т. 3. – № 1. – С. 28–33.
4. Чернухин В.А., Чмуж Е.В., Томилова Ю.Э., Наякишина Т.Н., Гончар Д.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Новая сайт-специфическая эндонуклеаза GluI узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN(5mC)G-5' // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2007. – Т. 3. – № 2. – С. 13–17.
5. Чмуж Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции BlnI из *Bacillus subtilis* T30 узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)NGC-3' // Биотехнология. – 2005. – № 3. – С. 22–26.
6. Madden T.L., Tatusov R.L. & Zhang J. Applications of network BLAST server // Meth. Enzymol. – 1996. – Vol. 266. – P. 131–141.
7. Pingoud A., and Jeltsch A. Structure and function of type II restriction endonucleases // Nucleic Acid Res. 2001. – Vol. 29. – P. 3705–3727.
8. Rebase official site <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>.
9. Smith H.O., Nathans D. A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes // J. Mol. Biol. – 1973. – Vol. 81. – P. 419–423.

Список сокращений

ExoIII – экзонуклеаза III из *E. coli*,

ПААГ – полиакриламидный гель,

ед. – единица активности,

5mC – 5-метилцитозин,

M. – ДНК-метилтрансфераза.

## **A NEW SITE-SPECIFIC METHYL-DIRECTED DNA ENDONUCLEASE PkrI RECOGNIZES AND CUTS METHYLATED DNA SEQUENCE 5'-GCN<sup>^</sup>GC-3'/3'-CG<sup>^</sup>NCG-5' CARRYING AT LEAST THREE 5-METHYLCYTOSINES**

V.A. CHERNUKHIN, T.N. NAYAKSHINA, D.A. GONCHAR, Ju.E. TOMILOVA,  
M.V. TARASOVA, V.S. DEDKOV, N.A. MIKHENKOVA, S.Kh. DEGTYAREV

*SibEnzyme Ltd., Novosibirsk*

We have discovered and purified a new methyl-directed site-specific DNA endonuclease PkrI from bacterial strain *Planomicrobium koreense* 78k. PkrI recognizes and cuts methylated DNA sequence 5'-GCN<sup>^</sup>GC-3'/3'-CGN<sup>^</sup>CG-5' carrying at least three 5-methylcytosines and doesn't cleave unmethylated DNA. Due to its ability to cleave only modified DNA PkrI may find a practical application in genetic engineering experiments as well as in determination of DNA methylation status.

*Keywords:* methyl-directed site-specific DNA endonuclease, DNA methylation.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОЙ АТМОСФЕРЫ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ КАЧЕСТВА СОЛЕННОЙ ПРОДУКЦИИ ИЗ ЛОСОСЕВЫХ ВИДОВ РЫБ

С.В. ДОБРЕНКОВА\*, Л.Р. КОПЫЛЕНКО, Е.Д. ПАВЛОВ, Е.В. ГАНЖА

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

В работе было исследовано влияние газовых смесей, состоящих из углекислого газа и азота в разных объемных соотношениях, на качество соленой продукции из лососевых видов рыб в процессе хранения. Подтверждено снижение степени гидролитических процессов липидов и уменьшение расстояния между миофибриллами в процессе хранения продукции при использовании газовых смесей, в которых объемная доля углекислого газа или азота составляла более 50%.

*Ключевые слова:* морская биотехнология, соленая продукция, микробиологические показатели, мышечная ткань, миофибриллы, модифицированная атмосфера, газовые смеси.

В настоящее время проблема сохранения качества, пищевой и биологической ценности рыбного сырья и продукции на его основе, путем разработки новых или совершенствования традиционных технологий является актуальной.

Интерес производителей пищевой продукции к технологиям упаковывания и хранения с использованием модифицированной газовой атмосферы растет. Это обусловлено большим количеством предложений поставщиков промышленного оборудования, полимерных материалов и газовых смесей на рынке РФ. Последние результаты ряда маркетинговых исследований показывают, что потребительский спрос и предпочтения покупателей ориентированы на «натуральную продукцию», изготовленную без использования консервантов, ароматизаторов и красителей. Поскольку обзорные и научно-аналитические публикации по разработкам технологий с использованием газовых сред имеют фрагментарный характер, то их внедрение в производственную практику основывается на рекомендациях зарубежных фирм, заключающихся в подборе упаковочных материалов, газовых сред и принципов работы с ними.

© 2011 г. Добренкова С.В., Копыленко Л.Р., Павлов Е.Д., Ганжа Е.В.

\* **Автор для переписки:**

Добренкова Светлана Владимировна,  
научный сотрудник ФГУП «ВНИРО»  
Тел.: 8(499)264-18-33, 264-16-33  
E-mail: svetlana.dobrenkova@yandex.ru

Необходимо сказать, что рыбная отрасль имеет разработанные технологии охлаждения, подмораживания и замораживания рыбного сырья, в которых или углекислый газ, или азот используются в качестве охлаждающих сред и сред для хранения. Применение этих газов связано с их биологическим действием, что позволяет значительно сократить процессы охлаждения, подмораживания и замораживания сырья, а также снизить скорость гидролитических процессов белков, накопление продуктов гидролиза липидов и сократить распад макроэргических соединений, например, аденозинтрифосфорной кислоты, в процессе хранения продукции.

Внедрение в производственный процесс предприятия технологии упаковывания рыбной продукции в атмосферу газовой среды нередко сопровождается выбором между технологией упаковывания под вакуумом.

В связи с вышесказанным целью настоящей работы явилось сохранение качества соленой продукции из лососевых видов рыб, упакованной в модифицированную атмосферу, состоящую из углекислого газа и азота в разных объемных соотношениях.

В качестве объекта исследования использовали соленую семгу (*Salmo salar Linnaeus*) в виде разделанного на филе куска, который упаковывали в полимерную пятислойную соэкструзионную пленку с барьерным слоем (производитель ООО «Полимеры XXI века», ТУ 2245-001-14660125-07). Барьер осуществляется в отношении кислорода не за счет создания физической преграды, а за счет химического связывания молекул

кислорода одним входящим в состав пленки слоем — сополимером этилена и винилового спирта (EVOH). По структуре пленка состоит из следующих слоев: полиэтилен высокого давления, адгезив, EVOH, адгезив и полиэтилен высокого давления по толщине слоев, мкм: 16,5/7,0/18,0/7,0/16,5, соответственно. Прочность полимерного материала при разрыве 28–32 МПа.

Для создания атмосферы вокруг продукта использовали газовые смеси в трех вариантах, в которых объемные доли углекислого газа и азота были: максимальными, составляли половину и минимальными. Углекислый газ обладает хорошей растворимостью в жирах и ингибирующими свойствами в отношении микроорганизмов и плесеней. Азот является инертным газом, который не оказывает влияния на качество упакованного продукта, но обеспечивает максимальное удаление остаточных количеств кислорода и тем самым предохраняет липиды от окислительной порчи.

Контрольными образцами служила соленая семга, упакованная под вакуумом.

Продукцию хранили в холодильниках при температуре от 0 до +5 °С. Образцы отбирали в соответствии с разработанной программой, согласно требованиям МУК 4.2.1847-04 «Санитарно-эпидемиологическая оценка обоснования сроков годности и условий хранения продуктов» [3] на 1-е, 12-е, 20-е, 29-е и 40-е сутки хранения.

Определение органолептических показателей — внешнего вида, консистенции, цвета мышечной ткани, вкуса и запаха проводили в указанные выше сроки в соответствии с требованиями ГОСТ 7449-96 «Рыбы лососевые соленые». Микробиологические показатели — количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), бактерии группы кишечной палочки (колиформы), *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, сульфитредуцирующие клостридии, дрожжи и плесени — исследовали общепринятыми методами. Массовую долю белка определяли на анализаторе Kjeltak-2300 фирмы «Foos». Для определения массовой доли липидов использовали метод Блайя и Дайера [4]. Кислотное число жира определяли по ГОСТ 7636-85.

Для оценки морфологических изменений мышечной ткани использовали гистологический метод исследований [2] с качественной и количественной оценкой результатов для образцов, хранившихся 12 и 40 суток. Образцы фиксировали в 4%-ном растворе формальдегида. Микроскопирование препаратов продольных и поперечных срезов мышечной ткани изучаемой рыбной продукции проводили при увеличении 400×. Для

определения плотности расположения миофибрилл использовали программное обеспечение Image J; статистический расчет осуществляли с применением программы Excel 2003; в каждом образце проводили не менее 50 измерений.

Органолептические показатели образцов продукции на протяжении всех испытаний соответствовали требованиям нормативно-технической документации (НТД). На 20-е сутки в контрольных образцах отмечалось наличие жидкой среды вокруг продукта, количество которой постепенно увеличивалось в течение эксперимента. При этом консистенция мышечной ткани, по сравнению с опытными образцами, была суховата.

Результаты микробиологических исследований показали отсутствие в продукции бактерий группы кишечной палочки — в 0,1 и 0,01 г; *Staphylococcus aureus* — в 0,1 и 0,01 г; патогенных микроорганизмов, в том числе *Salmonella* — в 25 и 50 г; *Listeria monocytogenes* — в 25 и 50 г; сульфитредуцирующие клостридии — в 0,1 и 1,0 г; дрожжи и плесени — в 1 г продукта.

В процессе хранения образцов значение показателя КМАФАнМ не превышало требований НТД и колебалось от  $3,2 \times 10^2$  до  $7,6 \times 10^4$  КОЕ/г (табл. 1). Максимальное значение показателя отмечалось в начале процесса хранения в опытных образцах 3-го варианта —  $3,7 \times 10^2$ , а в конце хранения в контрольных образцах —  $7,6 \times 10^4$ . При этом увеличение показателя на один порядок было у опытных образцов, тогда как у контрольных — на два порядка.

Содержание общего количества белка в исследуемых образцах составило от 19,6 до 20,4%.

Массовая доля липидов в образцах соленой семги колебалась от 19,2 до 23,5%.

Значение кислотного числа жира на первые сутки хранения составляло от 1,6 до 2,1 мг КОН/г (табл. 2). Процесс накопления продуктов гидролиза — свободных жирных кислот — интенсивнее всего протекал в контрольных образцах и опытных образцах 2-го варианта, в которых значение показателя на 29- и 40-е сутки увеличилось почти в 1,5 и 2 раза, соответственно, по сравнению с первыми сутками. Кислотное число на 29-е сутки в образцах первого и 3-го вариантов, по сравнению с контрольными образцами и образцами 2-го варианта, было значительно меньше. Полученные результаты свидетельствуют о снижении степени гидролитических процессов липидов при использовании газовых смесей, в которых объемная доля углекислого газа или азота более 50%.

Таблица 1

**Общая микробная обсемененность образцов соленой семги в процессе хранения  
при температуре хранения от 0 до 5 °С, КОЕ/г**

Варианты	Требования Сан-ПиН 2.3.2.1078-01	Срок хранения, сутки				
		1	12	20	29	40
1	1,0×10 <sup>5</sup>	9,6×10 <sup>2</sup>	6,8×10 <sup>3</sup>	6,6×10 <sup>3</sup>	4,5×10 <sup>3</sup>	6,2×10 <sup>3</sup>
2		3,2×10 <sup>2</sup>	1,0×10 <sup>4</sup>	7,4×10 <sup>3</sup>	2,9×10 <sup>3</sup>	1,9×10 <sup>3</sup>
3		3,7×10 <sup>4</sup>	5,9×10 <sup>3</sup>	5,3×10 <sup>3</sup>	3,2×10 <sup>3</sup>	5,1×10 <sup>3</sup>
Контроль		2,4×10 <sup>2</sup>	8,3×10 <sup>3</sup>	8,3×10 <sup>3</sup>	8,9×10 <sup>3</sup>	7,6×10 <sup>4</sup>

Таблица 2

**Значение кислотного числа образцов соленой семги в процессе хранения  
при температуре хранения от 0 до 5 °С, мг КОН/г жира**

Варианты	Срок хранения, сутки				
	1	12	20	29	40
1	1,9	-	2,4	2,6	2,6
2	1,6	-	2,5	2,8	3,1
3	1,7	-	2,0	2,6	2,8
Контроль	2,1	-	3,1	3,4	3,9

Таблица 3

**Гистологические изменения соленой семги в процессе хранения при температуре хранения от 0 до 5 °С**

№ п/п	Вариант	Срок хранения, сутки	Целостность миофибрилл	Целостность мышечных волокон	Плотность расположения миофибрилл, мкм	Наличие клеток периферической крови	Наличие поперечнополосатой исчерченности
1	Контроль – вакуум	12	+ <sup>1</sup>	+	$\frac{5 \pm 0,4}{1 - 13^5}$	ед.	+
2	1		+/-	+/-	$\frac{6 \pm 0,4}{2 - 16}$	* <sup>6</sup>	+
3	2		+/-	+/-	$\frac{13 \pm 0,9}{2 - 28}$	*	+
4	3		+/-	-	$\frac{15 \pm 1,1}{2 - 32}$	*	-
7	Контроль – вакуум	40	+/- <sup>2</sup>	+/-	$\frac{10 \pm 0,6}{4 - 26}$	*	+
8	1		+/-	+/-	$\frac{11 \pm 0,6}{2 - 20}$	*	+
9	2		- <sup>3</sup>	-	$\frac{9 \pm 0,6}{2 - 21}$	*	-
10	3		+/-	-	$\frac{8 \pm 0,7}{2 - 26}$	*	+

*Примечание:* <sup>1</sup> – целостность миофибрилл/волокон сохранена; <sup>2</sup> – целостность миофибрилл/волокон сохранена частично; <sup>3</sup> – миофибриллы/волокон разрушены; <sup>4</sup> – средняя и ошибка средней ( $M \pm m$ ); <sup>5</sup> – min и max значения показателя; <sup>6</sup> – клетки периферической крови не обнаружены

При исследовании структуры мышечной ткани ориентировались на классическое строение скелетных мышц низших позвоночных, в частности, рыб [1]. Оценку проводили по следующим гистологическим критериям: целостности мышечного волокна и миофибрилл; плотности расположения миофибрилл; наличию клеток периферической крови; наличию поперечнополосатой исчерченности (табл. 3).

Наличие клеток периферической крови — эритроцитов и лейкоцитов — при микроскопировании препаратов не было обнаружено, за исключением единичных клеток в контрольных образцах на 12-е сутки хранения. Кроме того, в них были выявлены и изменения мышечного волокна в виде разрыхления и нарушения целостности сарколеммы, вероятно, обусловленные разрушением аморфного вещества внешней базальной мембраны под действием в основном физических факторов.

В опытных образцах на 12-е сутки хранения среднее значение показателя плотности расположения миофибрилл составило 6, 13 и 15 мкм, а на 40-е сутки — 11, 9 и 8 мкм, соответственно. Просмотр препаратов мышечной ткани опытных образцов выявил, что уже на 12-е сутки их хранения имеются существенные различия в морфологическом строении ткани по сравнению с контрольными. Разницы в морфологических изменениях в образцах первого варианта в процессе его хранения не было — наблюдалось частичное разрушение саркоплазмы и наличие отдельных фрагментов миофибрилл. В образцах 2-го варианта, упакованных с использованием газовой смеси, на 40-е сутки хранения изменения в мышечной ткани были более выражены, чем в образцах первого и 3-го вариантов. Выявлены нарушения целостности сарколеммы, обнаружены крупные вакуоли в саркоплазме и фрагменты миофибрилл.

Соленая семга, упакованная по 3-му варианту, через 40 суток хранения имела более выраженные изменения, чем рыба, упакованная по первому варианту, — целостность сарколеммы нарушена и отмечено присутствие фрагментов миофибрилл.

Полученные результаты гистологических исследований позволяют сделать вывод, что хранение соленой продукции в газовых средах способствует уменьшению расстояния между миофибриллами. Выявлена следующая закономерность: чем больше объемная доля углекислого газа, тем больше плотность расположения, а, следовательно, меньше расстояние между миофибриллами; и наоборот — чем больше объемная доля азота в смеси, тем меньше плотность и больше расстояние расположения миофибрилл.

Таким образом, результаты исследований показали, что при использовании технологии упаковывания соленой продукции из лососевых видов рыб с массовой долей жира не менее 15% в модифицированную атмосферу для сохранения ее качества в процессе хранения при температуре от 0 до +5 °С наиболее предпочтительнее использовать газовые смеси, состоящие из углекислого газа и азота, в которых объемная доля первого максимальна.

## Литература

1. *Евгеньева Т.П.* Патология мышечной ткани. — М., 2000.
2. *Макоедов и др.* ВНИРО — 75 лет наблюдений, исследований, открытий. — М.: Изд-во ВНИРО, 2009.
3. МУК 4.2.1847-04 «Санитарно-эпидемиологическая оценка обоснования сроков годности и условий хранения продуктов».
4. *Bligh E.G. & Dyer W.J.* A rapid method of total lipid extraction and purification // *Can. J. Biochem. Physiol.* — 1959. — Vol. 37. — P. 911–917.

## USE OF MODIFIED ATMOSPHERE TO PRESERVE THE QUALITY OF SALTED PRODUCTS FROM SALMON FISH

S.V. DOBRENKOVA, L.R. KOPYLENKO, E.D. PAVLOV, E.V. GANJA

*All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography (FGUP «VNIRO»), Moscow*

We investigated the effect of gas mixtures of carbon dioxide and nitrogen at different volume ratios, the quality of salt production from salmonid fish species during storage. Confirmed by reducing the degree of hydrolytic processes of lipids and decreasing the distance between the myofibrils during storage products using gas mixtures in which the volume fraction of carbon dioxide or nitrogen was more than 50%.

*Keywords:* marine biotechnology, salted products, microbial colonization, muscle, myofibrils, a modified atmosphere gas mixtures.

УДК 60:615:378.016

## ОРГАНИЗАЦИЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ПОДГОТОВКИ СПЕЦИАЛИСТОВ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ В ПЕРМСКОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ АКАДЕМИИ

Е.И. МОЛОХОВА\*, А.В. КАЗЬЯНИН, Т.А. ШМАЛЬКО

ГОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию». Пермь

Представлены цель, задачи, перечень компетенций и практическая реализация по созданию учебно-производственного комплекса по подготовке специалистов фармацевтической биотехнологии.

*Ключевые слова:* биотехнология, биофармацевтика, образовательные программы, профессиональные компетенции.

Биотехнологии — одному из стратегических и перспективных направлений инновационного развития российской промышленности — уделяется большое внимание как в сфере научных исследований, так и прикладных разработок. Особенно это касается таких отраслей, как химическая, сельскохозяйственная, пищевая и др. В биофармацевтике приоритетными направлениями являются применение генно-инженерных технологий, методов микробиологического синтеза и конструирование биологически активных субстанций на основе наноструктур. Применение данных технологий позволяет в значительной степени обеспечивать потребности здравоохранения в вакцинах, витаминных препаратах, аминокислотах, стероидных гормонах. Вместе с тем потребности фармацевтического рынка отечественными лекарственными средствами удовлетворяются лишь на 25–30%. Одной из причин такого положения в отрасли, наряду с недостаточным количеством профильных фармацевтических предприятий, их низкой материально-технической оснащённостью, является дефицит подготовленных для работы на них специалистов-технологов, имеющих глубокие знания по биотехнологии. В российских фармацевтических учебных заведениях практически отсутствует подготовка высококвалифицированных кадров такого профиля для современного фармпроизводства и научных

исследований в сфере биоиндустрии [3]. Существующие технологические факультеты (Санкт-Петербург, Курск) обеспечивают, в основном, свои регионы.

Развивающаяся быстрыми темпами биофармацевтика требует изменения расстановки акцентов при изучении таких дисциплин, как микробиология, фармацевтическая технология, биотехнология, фармакогнозия. Сегодня учебные программы цикла общепрофессиональных специальных дисциплин фармацевтических вузов ориентированы на подготовку специалистов для работы в аптечных учреждениях и фармацевтических компаниях, занимающихся продвижением и реализацией лекарственных средств. Дисциплины, касающиеся изучения вопросов теории и практики производства лекарственных средств, особенно получаемых биотехнологическим путем, запланированы только на последних курсах с ограниченным количеством лекционных и практических занятий.

К этому времени многие студенты уже работают в аптеках и менять что-то в своей профессии не хотят. Поэтому лишь немногие выпускники трудоустраиваются на фармпредприятия в качестве организаторов производства, технологов или биотехнологов. Вместе с тем выпускники других вузов, имеющие биологическое, химическое или медицинское образование, с большим интересом идут работать на предприятия по производству иммунобиологических и фармацевтических лекарственных препаратов. Их, не имеющих основ и базовых знаний по технологиям, принимают на должности химиков, лаборантов, аппаратчиков, и только после определенного времени работы, с последующим прохождением стажировки, специализации и аттестации, они могут рассчитывать на получение должности инженерно-технических работников (ИТР).

© 2011 г. Молохова Е.И., Казьянин А.В., Шмалько Т.А.

\* **Автор для переписки:**

Молохова Елена Игоревна,  
доктор фармацевтических наук,  
профессор кафедры промышленная технология лекарств  
с курсом биотехнологии,  
Пермская государственная фармацевтическая академия  
614000 Пермь, , 3-я линия, 125  
E-mail: profmol@nm.ru

С учетом возрастающей роли биотехнологии кафедрой промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Пермской государственной фармацевтической академии (ПГФА) проводится интеграция научных и педагогических кадров, а также ведущих специалистов фармпредприятий по созданию единой структуры — учебно-производственного комплекса (УПК) по подготовке специалистов для биофармацевтических производств [2].

Основной целью данной структуры является разработка системной, поэтапной и целенаправленной подготовки будущих специалистов-биотехнологов, начиная с первых и до выпускных курсов обучения студентов фармацевтической академии. Это в полной мере учитывается в разработанном учебно-методическом комплексе (УМК) по биотехнологии кафедры.

Задачами курса биотехнологии как одной из профильных учебных дисциплин являются:

- обучение студентов деятельности провизора, исходя из знания основ молекулярной биологии, совершенствования производства методами генетической инженерии и инженерной энзимологии, знания фундаментальных основ методов контроля качества и подлинности препаратов, получаемых биотехнологическими методами;
- формирование у студентов практических умений и навыков получения биотехнологических лекарственных препаратов, оценки качества сырья, питательных сред, полупродуктов и целевых продуктов;
- выработка у студентов способности правильно оценивать соответствие биотехнологического производства правилам GMP, требованиям экологической безопасности, применительно к используемым на производстве биообъектам продуцентам и целевым продуктам, ориентации при оценке качества рекомбинантных белков как лекарственных препаратов;
- обучение студентов умению использовать иммуноферментные и радиоиммунные методы определения биологически активных веществ.

Профессиональные компетенции, идентифицирующие и дифференцирующие важнейшие элементы системы фармацевтического образования и позволяющие реально определять формы и методы контроля достигнутого студентом образовательного уровня [1], включают в себя следующие требования к уровню освоения дисциплины «Биотехнология».

Студент должен знать и уметь использовать:

- современные достижения фундаментальных биологических наук и биомедицинских технологий;
- концепцию видоспецифичности лекарственных веществ;
- инновационные пути создания лекарственных веществ на основе использования данных геномики, протеомики и биоинформатики;
- основные нормативные документы, относящиеся к производству, контролю качества, соблюдению экологической безопасности, хранению, международным и отечественным стандартам применительно к получаемым методами биотехнологии лекарственным средствам, а также биообъектам и их продуцентам.

Студент должен уметь:

- определять концентрации жизнеспособных клеток и их ферментативной активности;
- обеспечить требуемые условия хранения промышленных штаммов;
- учитывать влияние биотехнологических факторов на эффективность технологического процесса и качество конечного продукта;
- обеспечивать условия асептического проведения технологического процесса;
- оценивать применяемые на производстве и в лаборатории методы работы с рекомбинантными штаммами;
- проводить выделение и очистку лекарственных веществ из биомассы и культуральной жидкости;
- осуществлять постадийный контроль и стандартизацию получаемых препаратов (определение антимикробной активности антибиотиков, активности ферментных препаратов, жизнеспособности микроорганизмов);
- получать готовые лекарственные формы из лекарственных веществ биологического происхождения;
- осуществлять анализ биологически активных соединений методом иммуноферментного анализа;
- проводить исследования по совершенствованию биотехнологического процесса;
- информировать врачей о применении лечебно-профилактических препаратов (тест-систем);
- выбрать оптимальные условия хранения лечебно-диагностических препаратов и оценивать их качество в процессе длительного хранения;
- обеспечивать соблюдение правил промышленной гигиены, охраны окружающей среды, охраны труда и техники безопасности.

Студент должен иметь навыки:

- практической работы с НД: лабораторными, опытно-промышленными регламентами и др.;
- определения биологической активности антибиотиков, витаминов, гормонов, рекомбинантных белков и иммунобиопрепаратов;
- эксплуатации биореакторов и корректирования технологических параметров ферментации.

Студент должен иметь представление:

- об основных направлениях развития биотехнологии;
- о технико-экономических особенностях биотехнологических процессов;
- о ресурсах природных биоценозов как источников биологически активных веществ;
- об эволюции биосферы в результате антропогенной деятельности и о путях воздействия на этот процесс.

Для реализации освоения студентами поставленных задач в структуре теоретических занятий (лекций) по дисциплине в разделе «Общая биотехнология» читаются такие темы, как «Предмет, цели и задачи биотехнологии. Уровни развития биотехнологии. Объекты биотехнологии», «Структура биотехнологического процесса. Процессы и аппараты в биотехнологии. Биотехнологические параметры биосинтеза. Методы получения, выделения, концентрирования и очистки биотехнологических продуктов», «Совершенствование биообъектов методами мутагенеза и селекции. Создание новых биообъектов методами и генной инженерии», «Геномика и протеомика — современные направления развития биотехнологии», «Инженерная энзимология. Иммуобилизованные клетки и ферменты», «Современные биотехнологические препараты и средства доставки биопрепаратов в организм». По теме «Структура биотехнологического процесса» предусмотрено проведение практических занятий, рассматривающих методы получения, выделения, концентрирования и очистки биотехнологических продуктов, а также основные параметры биосинтеза. В разделе «Специальная биотехнология» на практических занятиях осваиваются следующие темы: «Правила организации биотехнологического производства», «Пробиотики: питательные среды, используемые в производстве, методы культивирования, контроль биотехнологических препаратов, приготовленных на основе культур пробиотических микроорганизмов», «Ферменты животного и микробиологического происхождения: технология и оценка качества», «Использование культуры ткани растительных клеток в промышленной технологии лекарств. Получение БАВ на основе растительных культур клеток», «Препараты крови человека. Биотехнологические аспекты получения. Основные иммунохимические

и физико-химические методы в производстве и контроле МИБП», «Технология препаратов бактериофагов», «Биотехнология современных вакцин», «Производство препаратов для иммунодиагностики. Принципы конструирования иммуноферментных тест-систем. Постановка твердофазного ИФА». Так, на практическом занятии по систематизации знаний о получении культур тканей лекарственных растений изучается информационный материал о химическом составе спирулины и технологии ее культивирования, проводится качественное определение фикоцианина методом ТСХ в образцах БАД, содержащих спирулину, а также составление технологической схемы получения биомассы культуры ткани раувольфии змеиной и выделения из нее технического аймалина. На занятии «Технология препаратов бактериофагов» студенты рассматривают основные этапы получения препаратов бактериофагов, методику определения их специфической активности методом Аппельмана, а также ассортимент препаратов бактериофагов. Учитывая объем информации по тематике разделов, ряду практических занятий предшествуют чтение лекции (по темам «Ферменты», «Культура ткани лекарственных растений», «Препараты крови человека», «Технология бактериофагов». «Биотехнология современных вакцин», «Основы иммуноферментного анализа»).

Контроль освоенного материала по разделам общей и специальной биотехнологии проводится путем тестирования, а также устного входного и выходного опроса по наиболее важным разделам дисциплины. В течение учебного семестра предусмотрено проведение двух колоквиумов и одной конференции по теме: «Современные биотехнологические препараты и средства доставки биопрепаратов в организм», на которой студенты представляют самостоятельно подготовленные доклады и презентации по биотехнологии лекарственных препаратов. Завершающим этапом изучения дисциплины является тестовый экзамен. Для более объективной оценки знаний, помимо тестовых заданий, экзаменуемому предлагается дать определение того или иного понятия и составить процессуальную схему получения биотехнологического препарата.

Используя возможности комплексирования учебного и производственного потенциалов кафедры, основные этапы биотехнологического процесса студенты осваивают на примере типовой технологической схемы получения препаратов для бактериотерапии. В ходе занятий по теме: «Пробиотики: питательные среды, используемые в производстве, методы культивирования, контроль биотехнологических препаратов, приготовлен-

ных на основе культур пробиотических микроорганизмов» студенты знакомятся с составом питательной среды МРС 1 и 5, используемой в производстве, и методами культивирования микроорганизмов-продуцентов. На одном практическом занятии проводится анализ основных показателей питательной среды (рН, аминный азот, стерильность) и посев лактобацилл на жидкую среду МРС 1, на другом занятии – контроль морфологии биотехнологических препаратов, приготовленных на основе культур пробиотических микроорганизмов; применяются и такие показатели, как содержание микробных клеток и активность кислотообразования. На практическом занятии «Производство препаратов для иммунодиагностики. Принципы конструирования иммуноферментных тест-систем. Постановка твердофазного ИФА» студенты участвуют в постановке прямой иммуноферментной реакции, используемой для оценке подлинности донорской крови.

Особое значение уделено освоению студентами правил организации биотехнологического производства. На занятии изучаются основы надлежащей производственной практики и контроля качества ЛС (GMP): термины и определения, принципиальные отличия системы управления качеством от контроля качества ЛС, требования, предъявляемые к персоналу, личной гигиене, одежде и санитарии, требования к производственному биотехнологическому процессу, в том числе и к производству препаратов крови.

Уровень профессиональной компетенции в области биотехнологии лекарственных средств учтен при разработке словаря терминов по биотехнологии (215 слов), которые студенты должны освоить в ходе изучения дисциплины, а также программы самостоятельной познавательной деятельности студента. В предложенном варианте программы самостоятельной работы, помимо наименования раздела и темы и ее содержания, обозначен вид деятельности студента, формы контроля усвоения материала этих разделов, а также определены показатели компетенции в терминах: знания, умения, навыки и представления.

Аналогичный подход был использован для составления методических рекомендаций для проведения практических занятий для студентов и особенно для преподавателей. Так, в методических рекомендациях для преподавателей специальное внимание уделено разделам: взаимосвязь с другими дисциплинами, уровень знаний по изучаемому материалу до и после изучения темы, воспитательное значение темы и ход проведения занятия. В методических рекомендациях для студентов выделены подразделы: основные понятия и вопросы для самоконтроля.

Формирование всех представленных материалов в виде учебно-методического комплекса «Биотехнология» значительно конкретизирует работу по составлению комплексных программ изучения этой профессиональной дисциплины совместно с кафедрами гуманитарного и естественнонаучного профиля. Накопленный в ПГФА опыт по развитию и внедрению научно-образовательных и практических проектов совместно с профильными предприятиями-производителями позволяет повысить мотивацию студентов в деле более эффективного изучения дисциплины и организовать подготовку кадров для развития отечественной биофармацевтики.

### Литература

1. Андреева И.Л., Пивоваров А.И., Уткина Т.Б. и др. Формирование компетенций студентов в системе профессиональной подготовки в фармацевтическом вузе // Фармация. – 2010. – № 1. – С. 53–56.
2. Казьянин А.В., Хволис Е.А., Молохова Е.И. Преподавание биотехнологии в фармацевтическом вузе // Материалы IV съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. Пуццино, 2006. – С. 306.
3. Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года. – М., 2009.

## PROVIDE TRAINING ON BIOTECHNOLOGY IN THE PERM PHARMACEUTICAL ACADEMY

E.I. MOLOCHOVA, A.V. KAZYANIN, T.A. SHMALKO

GOU VPO «Perm State Pharmaceutical Academy Federal Agency for Health and Social Development», Perm

Represented by the goal, objectives, a list of competencies and practical implementation to create educational and production complex in training pharmaceutical biotechnology.

*Keywords:* biotechnology, biopharmaceuticals, educational programs and professional competence.

## БИОТОПЛИВО ИЗ ВОДОРΟΣЛЕЙ – МИФ ИЛИ РЕАЛЬНОСТЬ?

Л.Х. ВАФИНА\*

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

Рассматриваются перспективы использования морских водорослей для производства альтернативных видов энергии, в том числе биотоплива. Существует исходная ресурсная база в акватории прибрежных морей и океанов Российской Федерации. Приводятся некоторые расчеты на основании достигнутых и прогнозируемых выходов биотоплива с единицы площади водорослевой марикультуры.

*Ключевые слова:* водоросли, марикультура, биотопливо.

В настоящее время происходит стремительное истощение мировых запасов энергоресурсов органического происхождения, приводящее к бедственному состоянию окружающей среды в целом. При этом цены на нефть и нефтепродукты стали значительно повышаться и, как предсказывают аналитики, еще будут повышаться. Для владельцев нефтяных скважин и нефтеперерабатывающих предприятий повышение цен не приводит к необходимости поиска возможностей производства альтернативных видов топлива, которые до этого были попросту нерентабельны ввиду дороговизны. Повышение цены на нефть более чем в два раза за последние три года так или иначе должно было вывести в разряд рентабельных ряд проектов, отложенных до лучших времен. Получение биотоплива сегодня — это новые разработки в области производства топлива, альтернативного нефтепродуктам, главным образом, для автомобилей.

Нефть — не единственное сырье для получения высокооктановой органики для двигателя автомобиля. Логичный выход на ближайшее время связан с поисками среди альтернативных способов синтеза высокооктановой органики, без применения истощающихся ископаемых ресурсов. Способов таких множество: один из наиболее популярных, ввиду сравнительно низкой себестоимости производства, — это производство спирта из возобнов-

ляемых природных ресурсов. Получаемый таким способом спирт можно заливать в бак в чистом виде, можно для дополнительной экономии смешивать с продуктами перегонки нефти. Но мест с подходящим климатом, где можно неограниченно выращивать кукурузу или пшеницу для превращения в спиртовое топливо с достаточной рентабельностью, ограниченное количество. Кроме того, если зерно использовать для производства спирта, то это создает проблемы с обеспечением пищевыми продуктами и кормами для сельскохозяйственных животных.

Известны технологии производства спирта из стеблей кукурузы или, например, целлюлозы, не отличающиеся особой рентабельностью, поскольку в среднем, потратив 1 МДж энергии, можно получить бензина на 1,19 МДж, кукурузного спирта — на 0,77 МДж и целлюлозного спирта — всего на 0,10 МДж. Есть и другие способы, вплоть до переработки использованного в кулинарии масла в биодизель, но многие из этих технологий пока балансируют на грани рентабельности.

Биомасса водорослей, аккумулирующая в себе солнечную энергию в форме углеводов растительного происхождения, может служить исходным сырьем для производства биотоплива в твердом, жидком и газообразном виде в зависимости от технологии переработки. В настоящее время в мире за основу принята классификация, утвержденная Директивой ЕС от 8 мая 2003 г. № 2003/30 ES «О мерах по стимулированию использования биологического топлива в транспортном секторе», согласно которой получили распространение следующие виды биотоплива: биогаз, биоэтанол, дизельное топливо и твердое биотопливо [1].

В поисках более рентабельной для переработки органики было обращено внимание на практически неис-

© 2011 г. Вафина Л.Х.

\* Автор для переписки:

Вафина Лилия Хаматовна, к.т.н.,  
заведующий лабораторией аналитического  
и нормативного обеспечения качества и безопасности,  
ФГУП «ВНИРО»

E-mail: vafinavniro@yandex.ru

черпаемый и легко возобновляемый ресурс — водоросли. Отдельно следует отметить, что биотопливный потенциал водорослей был предметом изучения специалистов Франции, Германии, Японии и США с 50-х годов прошлого столетия, при этом вопрос особенно обострялся во время нефтяного кризиса 70-х годов — в полной аналогии с нынешним состоянием дел. Морские водоросли в связи с содержанием в них липидов и углеводов также могут быть сырьем для производства биотоплива. С этой целью целесообразно использовать или непищевые водоросли или отходы глубокой переработки, как бурых, так и красных водорослей.

Что касается Российской Федерации, то необходимо отметить наличие достаточной по протяженности береговой линии, со значительным количеством морей, озер, болот и т.д. в отличие от других стран. Видовое разнообразие водорослей, представленных в российских водоемах, довольно обширно: бурые (примерно 85 видов), красные водоросли (примерно 130 видов) и зеленые (примерно 80 видов) [2]. Запасы фукусовых водорослей северных морей (Белое море и Баренцево море) оцениваются примерно в 80 тыс. тонн [4], Черного моря — в 85 тыс. тонн (для цистозире). Промысел фукусовых водорослей в России почти не ведется; цистозире в Черном море не добывают, а в северных морях в 2008 году изъята незначительная часть — около 50 тонн фукусовых водорослей (Карелия, Архангельская область). Это свидетельствует о том, что имеющиеся запасы фукусовых водорослей практически не используются. Между тем они представляют собой ценное сырье для производства биологически активных веществ (альгинат, фукоидан, маннит и др.), а остатки от производства можно применять не только в косметических целях, но и при производстве альтернативных видов топлива. Черноморскую же цистозире мало используют в связи с тем, что она очень жесткая и переработка ее для выделения биокомпонентов крайне затруднительна, но она может быть перспективным сырьем для производства биотоплива.

Сейчас целевыми продуктами переработки водорослей являются альгинат кальция, альгинат натрия, маннит, фукоидан, которые применимы в различных отраслях промышленности — от пищевой до медицины. Как известно, после выделения основных целевых продуктов переработки водорослей образуется большое количество водорослевого остатка, который имеет довольно разнообразный химический состав. Ведь целевые компоненты выделяются не на 100% и к тому же кроме них в составе водорослей находятся и другие вещества, например, клетчатка, что дает основание для их дальней-

шего использования [3]. В связи с этим целесообразно и их применять при создании биотоплива.

На основании данных сайта издания Permaculture Activist, представленных в таблице 1, можно судить о перспективности использования водорослей для производства биотоплива.

Таблица 1  
Годовой выход топлива с 1 акра (0,405 га)  
занимаемой площади

Используемое сырье	Выход, литр
Кукуруза	70
Соя	186
Сафлор	322
Подсолнечник	396
Рапс	493
Пальмовое масло	2460
Микроводоросли (достигнутые показатели)	7169
Микроводоросли (теоретические лабораторные показатели)	19375–58125

Результаты, приведенные в таблице 1, показывают, что выход топлива из водорослей в десятки раз превосходит такой показатель из традиционных наземных культур.

Ныне широко распространены три способа переработки водорослей в топливо, и все три позаимствованы из методик переработки масличных культур:

- с помощью пресса или маслоотделителя;
- селективная экстракция в надкритическом состоянии (Supercritical Fluid Extraction);
- селективное отделение и очистка с помощью гексана (Hexane Solvent Oil Extraction).

Надо указать на то, что в США проблемой получения недорогого биодизельного топлива для автомобилей занимаются десятки компаний и множество научных групп в разных университетах страны. Группа специалистов Центра технологий создания биотоплива (Center for Biorefining) при Университете штата Миннесота исследует возможности использования различных типов водорослей для получения недорогого биотоплива для автомобилей.

Главная цель, которая стоит перед исследователями в данной области, — это снижение себестоимости производства биотоплива. По словам представителей UOP LLC, подразделения Honeywell International по

разработке биотоплива, результат можно будет считать удовлетворительным в случае достижения уровня ниже \$2 за галлон (4,5 л). Многие специалисты согласны с тем, что, если авиационное топливо из водорослей будет стоить менее \$5 за галлон, а в идеале — менее \$3 за галлон, то такая технология вполне рентабельна.

Подобные российские разработки позволят не использовать пахотные земли для выращивания растений для производства биотоплива и соответственно избежать подорожания растительного масла и хлеба из-за использования урожая на производство топлива.

С учетом запасов фукусовых водорослей в акватории северных морей и Черного моря Российской Федерации можно оценить размер возможного общего допустимого улова (ОДУ) этих водорослей. Как правило, ОДУ оценивают примерно в 10% от запасов, в связи с чем получается: для Баренцева и Белого морей — около 8 тыс. тонн; а для Черного моря (цистозира) — около 8,5–9,5 тыс. тонн.

Отходы от выделения биокомпонентов водорослей составляют примерно 25–27% от массы исходного сырья, в связи с чем можно рассчитать количество остатков, которые могут образоваться при переработке 8 тыс. тонн фукусовых водорослей (ОДУ) — примерно 2,2 тыс. тонн, выход биотоплива из которых составит примерно 1,1 тыс. тонн. При использовании 9,0 тыс. тонн цистозиры (ОДУ) для изготовления биодизеля, согласно теоретическим расчетам, должно получиться около 4,5 тыс. тонн топлива. Итого получается, что при использовании фукусовых водорослей Белого, Баренцева и Черного морей можно в год вырабатывать примерно 5,6 тыс. тонн биотоплива, не используя при этом дополнительные пахотные земли, не затрачивая сил и материальных средств на выращивание культур, на их сбор и транспортировку.

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.

Таким образом, не используемые в других отраслях промышленности водоросли или их остатки после выделения БАВ могут быть использованы не только по прямому назначению (в качестве пищевого, лекарственного, сырья и сырья для производства БАВ, БАД и гидроколлоидов), но и для производства альтернативных видов топлива. Это даст возможность не только рационально использовать существующие запасы фукусовых водорослей, которые в настоящее время практически не применяются, но и обеспечить страну недорогим топливом без крупных инвестиций, улучшить экологическую обстановку, сильно пострадавшую за последние десятилетия.

#### Литература

1. Антифеев В.Н. Альтернативные источники энергии для автомобилей // Автомобильный транспорт. — 2002. — № 3. — С. 43–47.
2. Блинова Е.Н. Водоросли-макрофиты и травы морей европейской части России (флора, распространение, биология, запасы, марикультура). — М.: Изд-во ВНИРО, 2007. — 114 с. + 16 с. вкл.
3. Вафина Л.Х., Подкорытова А.В. Фукусовые и ламинариевые водоросли — основа для получения функциональных продуктов питания // Известия ТИНРО. — Владивосток: Изд. Центр ФГУП «ТИНРО-центр», 2009. — Т. 156. — С. 348–357.
4. Материалы, обосновывающие объемы общих допустимых уловов ВБР во внутренних морских водах, территориальном море, на континентальном шельфе, в исключительной экономической зоне РФ, а также в Азовском и Каспийском морях с низовьями впадающих в них рек. 2007. Том VI — Водоросли и морские травы.

## BIOFUELS FROM ALGAE – MYTH OR REALITY?

L.H. VAFINA

*All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography (FGUP «VNIRO»), Moscow*

The perspectives of the use of algae for the production of alternative energy, including biofuels. There is the initial resource base in the coastal waters of the oceans and seas of the Russian Federation. We present some calculations on the basis of ongoing and projected biofuel yield per unit area of algal mariculture.

*Keywords:* algae, mariculture, biofuels.

# МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ АЛЛЕРГЕНСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

О.В. ВОРОБЬЕВА\*, И.С. ГУЦИН

ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, Москва

В обзоре в историческом аспекте рассматриваются молекулярно-биологические основы и механизмы аллергенспецифической иммунотерапии.

*Ключевые слова:* аллергенспецифическая иммунотерапия, клеточные и молекулярные основы, механизмы, аллергены, генная инженерия, история.

## 1. Введение

Прогресс молекулярной биологии во второй половине XX века оказал большое влияние на весь спектр наук, в том числе на иммунологию и аллергологию. Это способствовало выяснению теоретических основ патогенеза аллергических заболеваний и обоснованию адекватных подходов к их диагностике, лечению и профилактике. Коснулся прогресс знаний и проблемы аллергенспецифической терапии (АСИТ). При этом активно разрабатывались иммунобиологические аспекты АСИТ, а другие механизмы практически не рассматривались [13, 40].

Как нами указывалось ранее [3, 5], эмпирическая и «интуитивная» стадии данного метода лечения аллергии закончились в 60–70-е годы XX столетия на фоне открытия IgE и других существенных достижений фундаментальной иммунологии, что нашло отражение в череде присужденных за это Нобелевских премий. К тому времени особое развитие получила клеточная иммунология. На базе теории естественного отбора Н.К. Йерне была сформулирована клонально-селекционная теория иммунного ответа [1, 2]. Утвердилась концепция иммунологической толерантности. Был сделан ряд открытий, крайне важных для аллергологии: выяснение пускового механизма высвобождения медиаторов из базофилов под воздействием аллергена; разграничение Т- и В-лимфоцитов и др. [42]. Существенным моментом явилась расшифровка моле-

кулярного строения иммуноглобулинов, включая общую структуру и особенности пяти их классов [34, 53].

## 2. Открытие IgE

При анализе исторического развития метода АСИТ целесообразно более подробно рассмотреть значение открытия IgE (этой теме посвящено довольно много сообщений, в основном ретроспективного характера — [7, 8, 11, 14, 55, 63, 101]). К моменту активизации в начале 1960-х годов поисковых работ по выявлению антитела — носителя реактивной активности (будущего IgE) — уже были известны три Ig: IgG, IgA (1959 г.), IgM; четвертый Ig — IgD был идентифицирован в процессе этих исследований в 1965 г. Rowe D.S., Fahey J.L. [93]. Сам факт открытия IgE по достоинству оценен специалистами, однако обстоятельства данного события часто преподносятся без детализации. Между тем существуют воспоминания главных его участников, которые целесообразно объективно прокомментировать [62, 65, 103], поскольку имеется элемент предвзятости в оценках. Абсолютный приоритет открытия IgE, безусловно, принадлежит работавшим в Денвере (США) супругам Кимишеги и Тэрука Ишизака (рис. 1): и по реальному времени (1966 год [60] — на один год раньше Г. Йоханссона, 1967 [66]), и по предшествующей серии работ, последовательно приближавшейся к цели.

Даже терминологически буква «Е» принадлежит японским исследователям: они тестировали реактивную активность с помощью эритемы («Erythema»), и первая буква этого слова была присвоена новому Ig. Особенно значимой вехой накануне самого открытия в 1966 г. явилась статья Ishizaka K. et al. 1963 года [59], в которой было показано, что сенсibilизация реагином (реакция

© 2011 г. Воробьева О.В., Гущин И.С.

\* Автор для переписки:

Воробьева Ольга Вадимовна

ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

115478 Москва, Каширское шоссе, 24, корп. 2

E-mail: ptashka095@rambler.ru



Рис. 1. Супруги Ишизака, первооткрыватели IgE

Праусница — Кюстнера) блокируется нормальным IgA человека и его очищенной альфа-цепью (публикация 1964 г.). В это время такого же взгляда придерживались и D.R. Stanworth, целеустремленно работавший в своей бирмингемской лаборатории над проблемой реакиновой активности [102], и J.F. Heremans с коллегами — первооткрыватели IgA [54]. Однако супруги Ишизака пошли дальше: через 3 года вышла в свет их работа [60], в которой однозначно было продемонстрировано, что реакиновая активность отличается от трех известных к тому времени иммуноглобулинов, включая и IgA. Антигену, вызывавшему такую активность, авторы дали наименование «антиген E». В последующих публикациях они закрепили свой успех [57, 58], подтвердив, что обнаруженный ими гамма-E-глобулин представляет собой отдельный класс Ig.

Как это нередко встречается в науке, параллельно и независимо в лаборатории в Упсале (Швеция) в сыворотке больного с миеломой (плазмноклеточной лейкемией) был открыт парапротеин «ND», в котором отсутствовали антигенные детерминанты тяжелых цепей четырех известных тогда иммуноглобулинов. Автор работы Г. Йоханссон сообщил в 2006 г., что работы велись начиная с 1965 года. В ходе исследования выяснилась связь Ig«ND» с реакином, материалы были опубликованы [64, 66]. Открытый Ig начали тщательно изучать, в том числе с помощью разработанного самими шведскими исследователями метода RAST. Шведы подключили к работе лабораторию Д. Стэнворта: в результате было найдено, что реакция Праусница — Кюстнера дозоза-

висимым образом блокируется изолированным Ig«ND» или Fc фрагментами ND белка. В 1967 году эти результаты были обсуждены на Нобелевском симпозиуме в Стокгольме и напечатаны [67], а в феврале 1968 года основные представители указанных трех лабораторий собрались в Лозанне (Швейцария) под эгидой ВОЗ. Исследователи пришли к консенсусу, что ими вместе был открыт новый пятый иммуноглобулин, который назвали «IgE». Договоренность была подкреплена совместной публикацией [33].

В связи с упомянутым интересна такая параллель в базовых открытиях в иммунологии. Часто рядом с европейцами или американскими учеными в нужное время и в нужном месте появлялись имена японских исследователей. Так, соавтором открытия дифтерийного антитоксина первым лауреатом Нобелевской премии по медицине Берингом стал японец С. Китасато; в швейцарском институте Йерне, создателя одной из фундаментальных теорий в иммунологии, выполнил свою выдающуюся работу С. Тонегава (удостоенный Нобелевской премии). Наконец, открытие IgE, как указывалось, пришлось на долю супругов Ишизака, трудившихся независимо от шведа Йоханссона. Известно также, что честь открытия цитокина IL-5 принадлежит японцу К. Такацу. На эту тему даже вышла специальная статья японских авторов [104].

Итак, открытие IgE и установленная его связь с аллергической реакцией I типа создали реальную основу для углубленных исследований химических и клеточных механизмов аллергии и соответственно поиска средств лечения. АСИТ и в те годы продолжала быть в числе эффективных методов, несмотря на побочные реакции и иные обстоятельства (в том числе снижение интереса к ней в Великобритании в 1980-е годы). К настоящему времени знания о путях синтеза IgE достигли высокого уровня, соответствующего нынешним молекулярно-биологическим стандартам [87]. Компактная схема по данному вопросу представлена на рисунке 2: приведены основные этапы индукции синтеза IgE [13].

### 3. Первые схемы аллергического ответа

Необходимо отметить, что идентификация IgE стала объединяющим фактором для открываемых на клеточно-молекулярном уровне разрозненных сведений, связанных с отдельными звеньями аллергической реакции. Важным моментом здесь стало то, что IgE вызывает иммунный ответ связыванием Fc рецепторов на поверхности тучных клеток и базофилов.

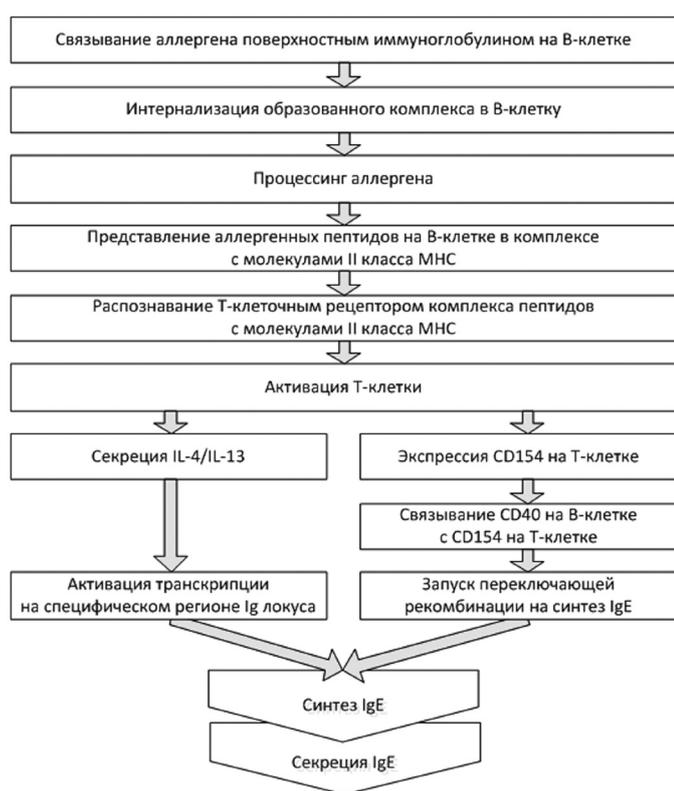


Рис. 2. Последовательность процессов, запускающих синтез IgE [13]

Это было найдено сначала, а затем такие рецепторы были обнаружены на эозинофилах, моноцитах, макрофагах и тромбоцитах человека. Имеется два типа рецепторов: высокоаффинный — FcεRI и низкоаффинный — FcεRII. FcεRI экспрессируется с наибольшей плотностью распределения на единицу клеточной поверхности на тучных клетках и базофилах, но выявлен и на других клетках. Накопление антигенов и связывание IgE с FcεRI на тучных клетках приводят к дегрануляции и высвобождению медиаторов из клеток, а базофилы, перекрестно связанные с IgE, высвобождают цитокины второго типа: IL-4 и IL-13 и другие медиаторы воспаления. FcεRII экспрессируется только на В-клетках, однако под влиянием IL-4 возможна его экспрессия и на поверхности макрофагов, эозинофилов, тромбоцитов и некоторых Т-клеток.

**3.1. Аллергический каскад.** 1970–1980-е годы стали периодом интенсивного накопления фактов в алергологии и иммунологии (открытие Б.И. Самуэльсоном лейкотриенов, за что он был удостоен Нобелевской премии в 1980 г.; обнаружение лимфокинов, описание интерлейкинов различных типов — IL-4 и др.). Это позволило создать первую интегральную схему аллергической реакции I типа, которая получила наименование аллергического (или воспалительного) каскада. На фоне

тех лет она обладала преимуществом перед современными сложными, утяжеленными деталями схемами — ясностью и относительной простотой, поскольку строилась на немногочисленных, но достаточно достоверных данных.

Аллергический каскад — это последовательность высвобождения биологически активных веществ (ферментов, гормонов, медиаторов), взаимосвязанная по времени и месту, в ответ на действие аллергена. Различают несколько стадий:

- Первоначальная аллергенная экспозиция.
- Презентация аллергена антиген-представляющей клеткой (АПК) Т-клетке.
- Активация В-клетки Т-клеткой.
- Высвобождение IgE В-клеткой.
- Прикрепление IgE к Fc рецепторам на поверхности тучных клеток и эозинофилов: антитела IgE примиряют указанные клетки и «ждут» повторной аллергенной экспозиции.
- Повторная аллергенная экспозиция.
- Прикрепление аллергена к комплексу IgE-FcεRI на тучных клетках или базофилах.
- Активация тучных клеток, их дегрануляция, высвобождение медиаторов и других веществ (базофилы выделяют медиаторы воспаления).
- Системные реакции на медиаторы: вазодилатация, гиперсекреция слизи, бронхоспазм и др.

Перечисленная цепь событий приведена на рисунке 3.

Эта схема, центральными фигурами которой являются IgE и тучные клетки, давала понимание сути реакции и теоретикам и практикам и намечала новые пути исследований. В фундаментальном плане речь шла о многофакторности (полифункциональности) процесса и поиске новых элементов в системе аллергического ответа, а в прикладном — о подборе соответствующих, адаптированных к патогенезу средств, воздействующих на то или иное звено каскада, включая изоляцию от аллергена, АСИТ, антицитокиновую и антиIgE-терапию и, наконец, фармакотерапию (антигистаминные препараты и др.).

**3.2. Th1/Th2-парадигма.** Определенной ступенью в объяснении избирательности возникновения IgE-ответа стала Th1/Th2-парадигма. Согласно данной концепции, эти два Т-хелпера находятся в состоянии динамического равновесия, изменение которого влечет за собой соответствующий вектор иммунной реакции. Было показано, что Th1 тип ответа обеспечивает клеточный иммунитет (и участвует в выработке некоторых субклассов IgG), а Th2 — гуморальный иммунитет (способствует также продукции IgE). Th1 вырабатывают интерферон-гамма



Рис. 3. Аллергический каскад. 1 — первая аллергенная экспозиция; 2 — синтез больших количеств IgE; 3 — прикрепление молекул IgE к тучным клеткам; 4 — повторная аллергенная экспозиция; 5 — IgE-примированные тучные клетки высвобождают гранулы и медиаторы, например, гистамин и цитокины; 6 — эти медиаторы вызывают характерные симптомы аллергии (по [55])

и IL-2, стимулируют пролиферацию цитотоксических T-лимфоцитов и активируют макрофаги. Th2 продуцируют IL-4, IL-5, IL-6, стимулируют пролиферацию и дифференцировку B-лимфоцитов, а также синтез антител разных классов. Считается, что смещение баланса в сторону Th2 вызывает IgE-ответ.

**3.3. Новые подходы.** Однако в последнее время эта популярная гипотеза уточняется в связи с обнаружением других типов T-хелперов, в частности Th17-клеток, которые выполняют отдельные эффекторные и регуляторные функции [13, 96]. Найдена еще субпопуляция Th9-клеток, активирующих продукцию IL-9. Новые перспективы исследований появились благодаря раскрытию вклада T-регуляторных клеток в генерацию аллергического ответа [17, 30, 69, 81]. Показана также роль тимического стромального лимфопоэтина — TSLP (это цитокин, по химическому составу сходный с IL-7) в инициации регуляторной функции, направленной на облегчение аллергического воспаления [15]. Было выяснено, что TSLP ускоряет созревание базофилов определенного типа в костном мозге, которые развиваются в тучные клетки — ключевой эффекторный элемент аллергической реакции. Появились работы о модулирующем влиянии Toll-подобных рецепторов на CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-регуляторные клетки [75]. Так что подкупающая простота линии Th1–Th2 (которая нередко служила и служит обоснованию патогенетических подходов к лечению аллергии I типа) постепенно заменяется объяснением с привлечением более сложных конструкций.

#### 4. Современные представления об аллергической реакции

За прошедшие почти полвека после открытия IgE молекулярно-биологический уровень исследований позволил значительно продвинуться в понимании сущности аллергического процесса. Исторический метод позволяет проследить преемственность накопления фактов и подвести к высокой планке современного состояния данной проблемы. Здесь имеются и веховые теоретические события (как, например, открытие MHC-рестрикции при T-клеточном распознавании П. Догерти и Р. Цинкернагелем, всесторонний анализ цитокинов, простагландинов и т.д.), были и методические прорывы (разработка гибридомной техники, получение МАТ, ПЦР-метод, секвенирование нуклеотидных последовательностей, генная инженерия, наконец, геномные и постгеномные технологии).

В результате сейчас теоретики и практики аллергологии имеют возможность опираться на руководства, включающие в себя обобщенные схемы, подготов-

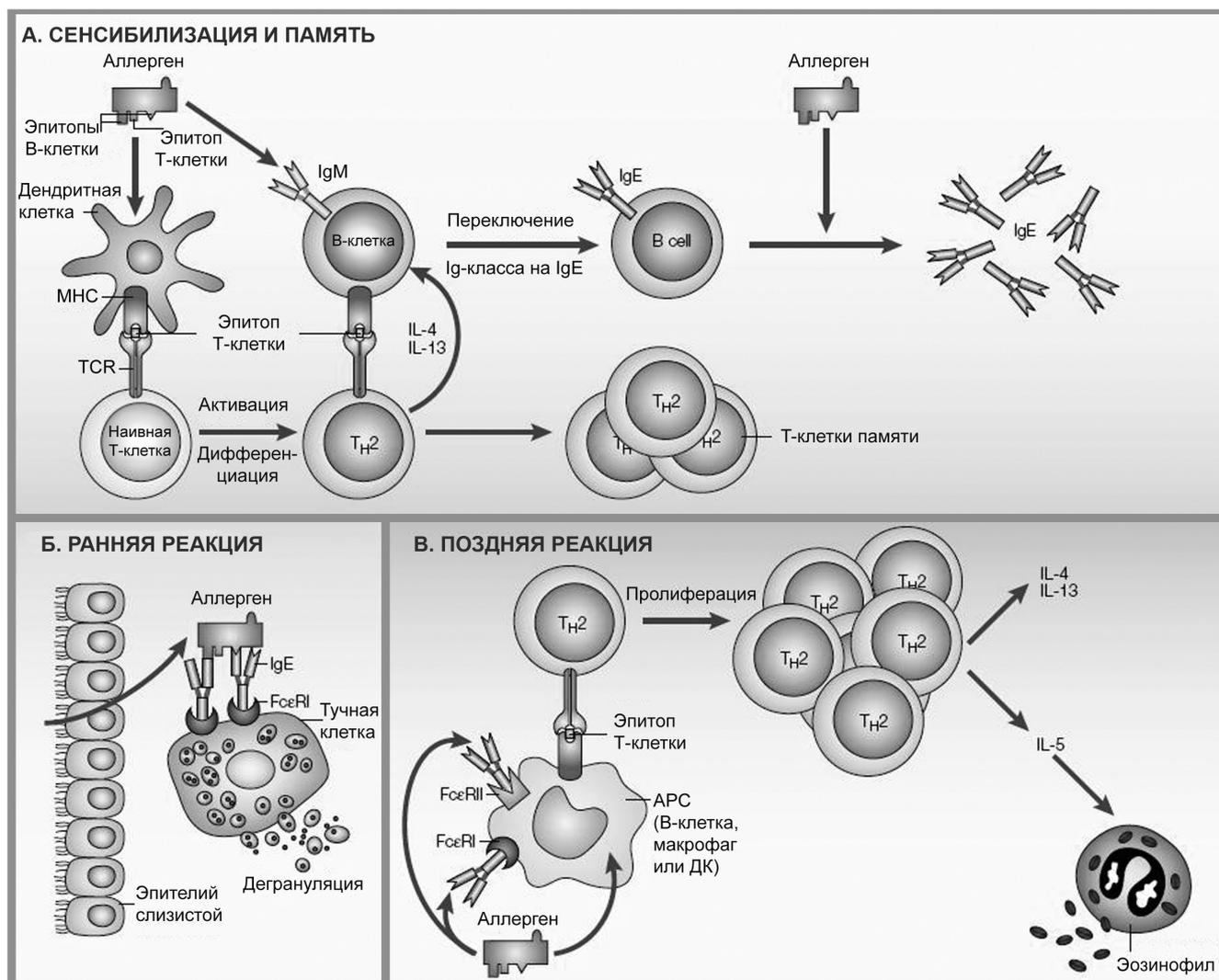


Рис. 4. Схема аллергической реакции в разных фазах: А – сенсibilизация и память; Б – ранняя реакция; В – поздняя реакция. Обозначения: APC – антиген-представляющая клетка; ДК – дендритная клетка; МНС – главный комплекс гистосовместимости; TCR – Т-клеточный рецептор (объяснение в тексте) (по [108])

ленные специалистами. Принято выделять три фазы IgE-опосредованной аллергической реакции I типа: сенсibilизация и память, ранняя фаза, поздняя фаза. Демонстративно они представлены в работе Valenta R. (2002) [108] (рис. 4).

**4.1. Сенсibilизация и память.** Как видно на рисунке 4А, в первой фазе сенсibilизации аллерген, проникающий через кожу и слизистую, захватывается антиген-представляющими клетками – дендритными клетками (ДК) и/или В-клетками (с помощью иммуноглобулина). При активации Th2-клеток начинают вырабатываться такие цитокины, как IL-4 и IL-13, которые способствуют переключению специфических В-клеток на продукцию IgE (то есть сенсibilизацию). Сенсibilизация приводит к установлению IgE памяти В-клеток и аллергенспецифической памяти Т-клеток. Повторный

контакт аллергена активирует IgE-положительную память В-клеток, чтобы получить помощь Т-клеток для продукции повышенных уровней аллергенспецифических IgE антител. Они посредством специфических рецепторов FcεRI и FcεRII прикрепляются к поверхности тучных клеток, базофилов, моноцитов, ДК и В-клеток.

**4.2. Ранняя (немедленная) фаза.** Ранняя фаза (на рис. 4Б – реакция) характеризуется перекрестным связыванием при повторной экспозиции аллергена с прикрепленным к эффекторной клетке IgE в комплексе с FcεRI, что приводит к высвобождению медиаторов (гистамина, лейкотриенов, простагландинов, фактора активации тромбоцитов и др.) вследствие дегрануляции, вызывая таким образом немедленные симптомы аллергии: сокращение гладкой мускулатуры, гиперсекрецию слизи и т.д.

**4.3. Поздняя фаза.** Поздняя фаза (реакция) наступает в пределах 4–6 ч (рис. 4В), когда происходит представление аллергенов Т-клеткам, которые становятся активированными, пролиферируют и высвобождают провоспалительные цитокины: IL-4, IL-5, IL-13. Этот процесс может усиливаться IgE-опосредованной презентацией аллергенов Т-клеткам. Th2 цитокины (например, IL-5) индуцируют тканевую эозинофилию и высвобождение воспалительных медиаторов из эозинофилов. Таким образом, происходит хронизация процесса, поддержание аллергического воспаления в ткани, усиление аллерген-неспецифической тканевой гиперреактивности.

Перечисленные сведения общеизвестны и отражают лишь часть многогранной проблемы аллергического ответа, однако они необходимы в плане рассмотрения в статье механизмов АСИТ.

## 5. Механизмы АСИТ

Довольно большой объем информации по АСИТ позволил в последней четверти XX века ставить вопрос о механизмах лечебного воздействия данного метода. Предыстория здесь берет начало от исходной точки 1911 года, когда в рамках неверной теоретической доктрины первооткрывателям метода Л. Нуну и Дж. Фримену удалось эмпирически добиваться положительного клинического результата.

Далее в домолекулярный период врачи обходились умозрительными представлениями о реакциях и блокирующих антителах. Начиная с рубежа 1960-х годов постепенно, вместе с объяснением собственно аллергического процесса предпринимались попытки найти патогенетическое толкование терапевтического влияния АСИТ. Причем это делалось наряду с более приоритетными для того времени исследованиями эффективности и безопасности метода, включая контролируемые [4].

Полные схемы, отражающие механизмы АСИТ, появились не сразу, что вполне объяснимо в связи с последовательным раскрытием составных элементов (клеточных и молекулярных) системы, являющихся местами приложения полифункционального действия лечебного агента.

Было отмечено влияние иммунотерапии антигенами амброзии на содержание IgE и IgG [50]. продемонстрировано влияние АСИТ на накопление и хемотаксическую активность эозинофилов [88].

Связь между Т-клеточным ответом и иммунотерапией была впервые показана в 1980 г. Rocklin R.E. et

al. [91]. Накапливались данные об участии в механизмах АСИТ различных классов и подклассов иммуноглобулинов (IgG4, IgA2), интерферона-гамма, трансформирующего фактора роста-бета (TGF- $\beta$ ), интерлейкинов (IL-12, IL-5).

Заметным событием явились работы Akdis C.A. et al. (1998, 1999) о роли IL-10 и регуляторных Т-клеток [23, 27]; вышел также в свет цикл работ о значении Т-клеточной анергии.

Принципиальным моментом стала серия исследований, выдвинувших идею о сдвиге при АСИТ аллергенспецифического Th2 ответа к Th1 ответу как на периферии, так и в органах-мишенях [44, 45, 47, 110]. Продолжает развиваться на новом уровне концепция блокирующих антител (рассуждения о реакциях были полностью вытеснены IgE).

**5.1. Доза-эффект.** Помимо обнаружения деталей механизма АСИТ, постоянно вставал общий вопрос о соотношении «доза-эффект», что особенно важно для такого интегрального метода. Существуют десятки работ, в которых указываются дозы [например, 79], однако специальных исследований дозозависимости АСИТ сравнительно мало. Ныне в соответствии с доктринами доказательной медицины принято делать достоверные заключения на основании мета-анализов.

Подобное исследование было недавно проведено рабочей группой ЕААСИ в составе 13 человек, в котором изучалась зависимость «доза-эффект» при АСИТ [35]. В нем было проанализировано 15 работ, отвечавших критерию включения, и 12 работ, нацеленных на изучение дозозависимого влияния на клиническую эффективность. Несколько дозозависимых работ было посвящено вопросам иммунологии и безопасности. Показано, что сравнительного анализа нельзя было провести из-за несопоставимости параметров (различные референс-материалы, методология определения аллергена, дизайн исследования и др.). Соответственно не было дано никаких рекомендаций в отношении зависимости «доза-эффект».

Тем не менее среди специалистов утвердилось мнение о высокодозовом положительном лечебном эффекте АСИТ по сравнению с низкодозовым режимом [13]. Особенно это показательно при использовании ударной (или «стремительной» от англ. «rush») терапии. Но даже при обычных протоколах поддерживающие дозы при подкожной иммунотерапии (ПКИТ) многократно превышают количества аллергена, поступающего в организм естественным путем, а при сублингвальной иммунотерапии (СЛИТ) превосходят в десятки или

сотни раз. Очень важно судить о градации дозировки и вызываемого эффекта. На этот счет имеется схема, которая демонстрирует зависимость формирования той или иной аллергической реакции от силы аллергенного воздействия при АСИТ (рис. 5) [13].



Рис. 5. Влияние низких или высоких доз вводимого при АСИТ аллергена на формирование соответствующего типа реакции (гиперчувствительности или толерантности) [13]

**5.2. Действие АСИТ на отдельные звенья и составные элементы аллергической реакции.** АСИТ действует на все звенья и структурные элементы аллергического ответа. Целесообразно рассмотреть отдельно молекулярные и клеточные составляющие этого процесса.

**5.2.1. Молекулы.** Ключевым моментом является реакция иммуноглобулинов на АСИТ. Динамика содержания IgE при АСИТ такова. Вначале наблюдаются незначительные изменения, а повторные курсы АСИТ приводят к уменьшению содержания аллергенспецифического IgE по сравнению с исходным уровнем.

Продолжительное лечение также заметно подавляет сезонный прирост содержания IgE. Отмечается значительное повышение (в десятки и сотни раз) содержания IgG1 и IgG4 и умеренное увеличение уровня IgG2. Обнаруживали реакцию на подкожный вариант АСИТ и другие Ig — например, повышался в сыворотке крови уровень IgA, в том числе IgA2. В последние годы увеличение содержания IgA было отмечено и при СЛИТ [38], включая подъем пиковых значений IgA1 и IgA2 [95].

**5.2.2. Клеточные элементы.** АСИТ влияет на клеточные элементы следующим образом [29]:

- эозинофилы — уменьшение их числа и снижение высвобождения медиатора;

- базофилы — снижение продукции провоспалительных цитокинов, уменьшение секреции медиатора;
- тучные клетки — уменьшение количества, снижение продукции провоспалительных цитокинов, уменьшение высвобождения медиатора;
- АПК — дендритные клетки: супрессия облегченной IgE презентации аллергена;
- В-клетки — увеличение уровня IgE в сыворотке крови в ранней фазе и его снижение в поздней фазе, повышенная продукция IgG1 и IgG4, а также IgA, супрессия облегченной IgE презентации аллергена;
- Т-клетки — супрессия Th2-клеток и цитокинов, индукция Т-регуляторных клеток, повышенная секреция IL-10 и TGF- $\beta$ .

**5.3. Механизмы ПКИТ и СЛИТ (обобщенные схемы).** За 100-летний период применения АСИТ как десенсибилизирующей терапии сформировалось достаточно полное представление о механизмах ее лечебного действия [6, 21, 22, 24, 26, 27, 29, 31, 36, 38, 39, 41, 49, 52, 56, 61, 68, 70, 72, 73, 77, 83–86, 90, 92, 94, 97, 99, 100, 105].

Во-первых, оно состоит в раннем десенсибилизирующем эффекте, модуляции ответов Т- и В-клеток и связанных с ними изотипов антител, миграции эозинофилов, базофилов и тучных клеток к тканям, а также высвобождению их медиаторов.

Во-вторых, выход на первый план Т-регуляторных (Treg) клеток как основных регуляторов иммунных процессов в ходе развития периферической толерантности к аллергенам [20, 30, 110]. Сдвиг аллергенспецифических эффекторных Т-клеток к регуляторному фенотипу, по-видимому, является ключевым событием в развитии нормальной иммунной реакции на аллергены и успешном исходе лечения у больных, подвергшихся АСИТ. Естественно встречающиеся Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-регуляторные клетки и индуцируемые Tr1 клетки вносят вклад в контроль аллергенспецифических иммунных ответов с помощью нескольких воздействий:

- супрессии дендритных клеток, что подтверждает генерация эффекторных Т-клеток;
- супрессии эффекторных Th1, Th2 и Th17 клеток;
- супрессии аллергенспецифического IgE и индукции IgG4;
- супрессии тучных клеток, базофилов и эозинофилов;
- подавления миграции эффекторных Т-клеток к тканям.

Описанные процессы представлены на рисунке 6.

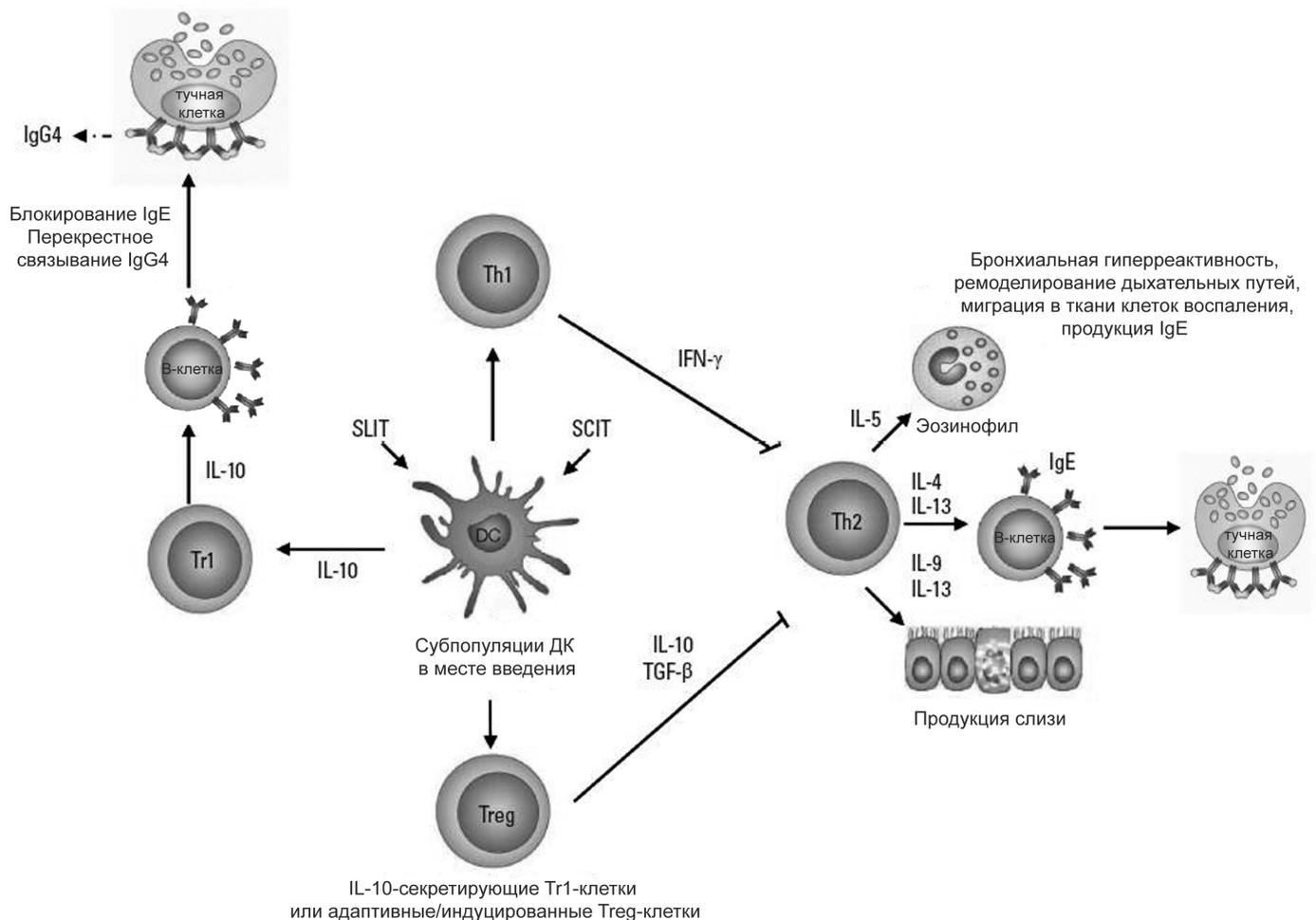


Рис. 6. Схема, отражающая механизмы аллергенспецифической иммунотерапии. Обозначения: SLIT – сублингвальная иммунотерапия; SCIT – подкожная иммунотерапия; Treg – Т-регуляторные клетки; TGF-β – трансформирующий фактор роста-β; IFN-γ – интерферон-γ; DC – ДК (дендритная клетка) (по [31])

На этом рисунке видно, что как SKIT, так и SLIT сначала влияют на местные АПК – дендритные клетки в месте введения аллергена и в дренажных лимфоузлах. ДК индуцируют Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-регуляторные клетки и Tr1-клетки (IL-10-положительные) [31]. Затем запускается вышеупомянутая цепь событий.

Если сравнить приведенные последние данные о механизмах АСИТ с известным ВОЗовским руководством WHO Position Paper более чем 10-летней давности (1998 г.) [78], то становится ясно, насколько существенно продвижение в понимании молекулярно-биологических основ этого процесса.

Следует указать на отдельные интересные гипотезы и факты. Так, высказано предположение, что Т-регуляторные клетки непосредственно супрессируют аллергенспецифический Th2-ответ [32]. Появились ра-

боты с использованием математического моделирования: показано, что ключевыми ответами при АСИТ являются пролиферация Treg клеток и супрессия Th2 клеток, а высокодозовый режим инъекций с короткими интервалами может усиливать эти эффекты [51].

Принято говорить о едином механизме SKIT и SLIT [32, 84, 94]. Тем не менее целесообразно привести выводы WAO (2009) [36], суммирующие последние данные о механизмах SLIT (о SKIT существует большая литература, в которой излагается консолидированная позиция, основанная на современных согласительных документах, например, [38, 77]):

1. АСИТ дает возможность изучать антиген-специфическую толерантность у человека.
2. SKIT подавляет аллергическое Th2-опосредованное воспаление и повышает уровень антиген-специфического IgG, вероятно, с помощью

T-регулируемого иммунного сдвига (Th2 – Th1) и/или апоптоза T-клеток.

3. Слизистая полости рта является естественным местом индукции иммунной толерантности (клетки Лангерганса, FcεRI, IL-10, IDO – индоламин-2-3-диоксигеназа).
4. СЛИТ в оптимальных дозах эффективна и может вызывать ремиссию после прекращения лечения и предотвращать новую сенсibilизацию – результаты, сходные с индукцией толерантности.
5. СЛИТ связана с:
  - задержкой аллергена в сублингвальной слизи на несколько часов;
  - значительным ранним повышением уровня антиген-специфического IgE, торможением сезонного уровня IgE;
  - умеренным увеличением антиген-специфических IgG4, блокирующих активность IgE;
  - торможением эозинофилии, снижением содержания молекул адгезии в органах-мишенях;
  - некоторыми свидетельствами повышения периферического T-клеточного IL-10.
6. СЛИТ вызывает умеренные системные реакции, аналогичные таковым СКИТ, однако дополнительные местные механизмы в слизистой полости рта и регионарных лимфоузлах, вероятно, имеют значение.

В связи с последним тезисом необходимо также остановиться на роли периферического звена в индукции аллергенспецифической реакции. На рисунке 7 изображена удачная схема, отображающая последовательность процессов проникновения аллергена при СЛИТ через слизистую полости рта и вызываемых им ответов, а также клеточно-молекулярные механизмы, соответствующие каждому этапу [80].

Слизистая полости рта, кроме барьерного предназначения, выполняет иммунокомпетентные функции. На рисунке 7 показано, что на первом этапе проникновения аллергена в эпителий используются механизмы фагоцитоза, макропиноцитоза, опосредованного рецептором эндоцитоза. Далее в течение от нескольких секунд до часов осуществляется захват аллергена клетками Лангерганса, точнее, лангергансоподобными ДК, положительными по CD1a, FcεRI, CD23, CD11b, CD207. Затем в пределах от нескольких минут до 24 ч идет миграция через слизистую в дренажные лимфоузлы.

На уровне lamina propria происходят изменения реакции молекул, контролирующей миграцию/адгезию: E кадгерин уменьшается (?), CCR7 увеличивается (?).

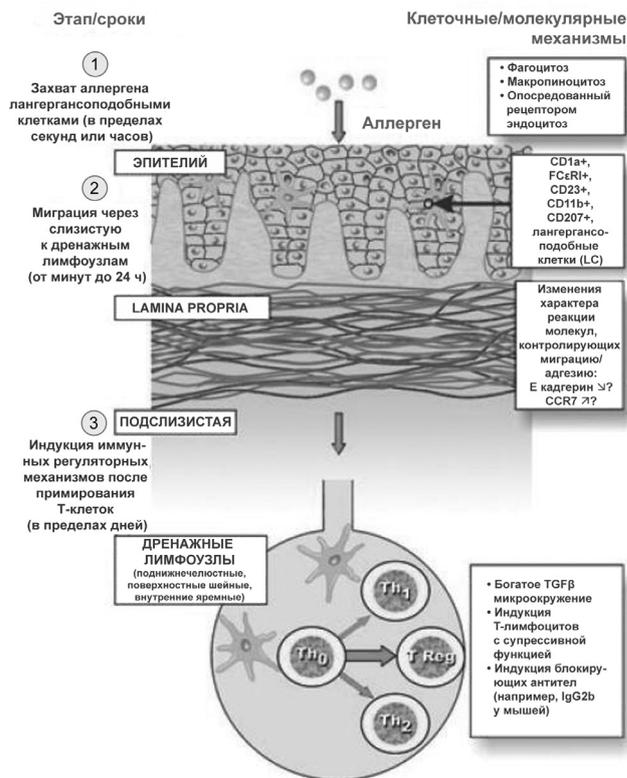


Рис. 7. Аллергенспецифические процессы в слизистой полости рта (объяснение в тексте) (по [80])

На следующем этапе после примиривания T-клеток (в течение нескольких дней) индуцируются иммунные регуляторные механизмы. В дренажных лимфоузлах (поднижнечелюстных, поверхностных шейных, внутренних яремных) формируется богатое TGF-β микроокружение, генерируются T-лимфоциты с супрессивной функцией, индуцируются блокирующие антитела (например, изотип IgG2b у мышей). Существенным обстоятельством является то, что слизистая полости рта содержит мало или вообще не содержит тучных клеток, эозинофилов и базофилов, а lamina propria представляет собой надежный барьер для их проникновения из подслизистой или крови и установления контакта с аллергеном. В этом, возможно, заключается одна из главных первопричин формирования периферической толерантности и вторичная причина – безопасность метода СЛИТ: ни одного смертельного случая за 30 лет применения.

**5.4. Концепция блокирующих антител: современное состояние.** Примерно 30-летний бум, связанный с открытием IgE, отодвинул на второй план тему значения IgG как блокирующих антител. Однако постепенно эта идея стала вновь обретать доказательства, активно обсуждаться и поддерживаться такими авторитетными исследователями, как R. Valenta [48, 108], S.R. Durham

[105] и ряд других авторов. Например, в обзоре R. Valenta (2002) [108] упоминается работа Bal T. et al. (1999), в которой было показано, что индуцированные при АСИТ IgG (главным образом IgG1 и IgG4) конкурируют с IgE за места связывания на аллергене, что предотвращает вызванную аллергеном активацию базофилов и соответственно высвобождение медиаторов. В другом исследовании (Van Neerven R.J. et al., 1999) (цит. по: [108]) было продемонстрировано, что блокирующие антитела значительно тормозят IgE-опосредованную презентацию аллергенов Т-клеткам, что может вызывать активацию Th2 клеток и последующее выделение Th2 цитокинов. Протективная функция блокирующих антител может наблюдаться в ранней и поздней фазах аллергического ответа. В связи с этим ставился вопрос о возможности пассивного введения блокирующих антител при лечении аллергических заболеваний. Аналогичные примеры приводятся в работе Till S.J. et al. (2004) [105]. Так, они цитируют Garcia B.E. et al. (1993), которые выявляли при АСИТ, что индуцированный IgG4 блокирует высвобождение гистамина базофилами под влиянием вызванного аллергеном IgE. Wachholz P.A., Soni N.K., Till S.J., Durham S.R. (2003) (цит. по: [105]) нашли *in vitro* супрессию IgG4 аллергенспецифического Т-клеточного ответа посредством торможения связывания комплексов IgE-аллерген с АПК. Однако против модели блокирующих антител выдвигаются возражения. Одно из них основывается на слабой корреляции между концентрацией IgG и клиническим эффектом. Особенно это показательно в случае применения сверхударных («ultrarush») доз: позитивный результат наблюдается задолго до обнаружения продукции IgG антител.

В последнее время специальных работ, посвященных блокирующим антителам, публикуется сравнительно мало, хотя эта концепция как рабочий механизм фигурирует во многих интегральных схемах, поясняющих принцип действия АСИТ. Надо также отметить, что в Белой книге WAO-2011 [32] обращается внимание на роль IgG, в особенности IgG4, в связи с новыми результатами. Так, показаны IgG-зависимая способность сыворотки крови после АСИТ тормозить связывание комплексов антиген-IgE с В-клетками, блокирование последующей облегченной IgE презентации аллергена и активации аллергенспецифических Т-лимфоцитов, а также предупреждение аллерген-IgE-зависимой активации периферических базофилов.

**5.5. Толерантность и АСИТ.** Понятие толерантности широко используется при объяснении механизмов АСИТ в качестве одного из инструментов теории и

методологии иммунобиологии. Между тем оно имеет и самостоятельное значение как часть проблемы толерантности к «чужому», а именно: к экзогенным непатогенным антигенам (включая аэрогенные и пищевые). Учение Йерне о преформированности иммунного ответа и особенно гипотеза идиотипических сетей позволяют делать теоретические предположения по данному вопросу. В этом отношении заслуживают интерес работы адепта Йерне M. Zouali [111, 112], в которых делаются выводы, имеющие значение для АСИТ. Наиболее ценными являются его заключения о дозозависимости при действии антигена и толерантности (рис. 8).



Рис. 8. Высоко- и низкодозовая толерантность (по [111])

Рисунок иллюстрирует мнение данного автора о том, что низкие и высокие дозы антигена вызывают толерантность, а промежуточные (средние) — иммунный ответ. При этом он ссылается на то, что низкодозовая толерантность индуцируется к ряду антигенов у новорожденных. У взрослых, как известно, толерантность обычно возникает при высокодозовом режиме воздействия аллергена. Важную роль в профилактике и лечении аллергии Зуали отводит индукции периферической толерантности. Проблеме толерантности был посвящен ряд исследований С.А. Akdis с коллегами [25], и на ней основано одно из ключевых положений его теоретических построений [28]. В целом это направление нуждается в дальнейшей разработке. Однако в контексте толерантности хотелось бы привести аналитический обзор Ahern D.J. & Robinson D.S. [18], основанный главным образом на экспериментальных данных. Правда, они базируются на работах 2004–2005 гг., а сейчас информация быстро

«старее», тем не менее обобщающие идеи, высказанные этими исследователями, представляют интерес.

Авторы, опираясь на модель экспериментальной аэрогенной аллергии на мышах, дают схему (рис. 9), отображающую систему факторов, поддерживающих баланс между Th2-ответом и толерогенными Treg клетками.

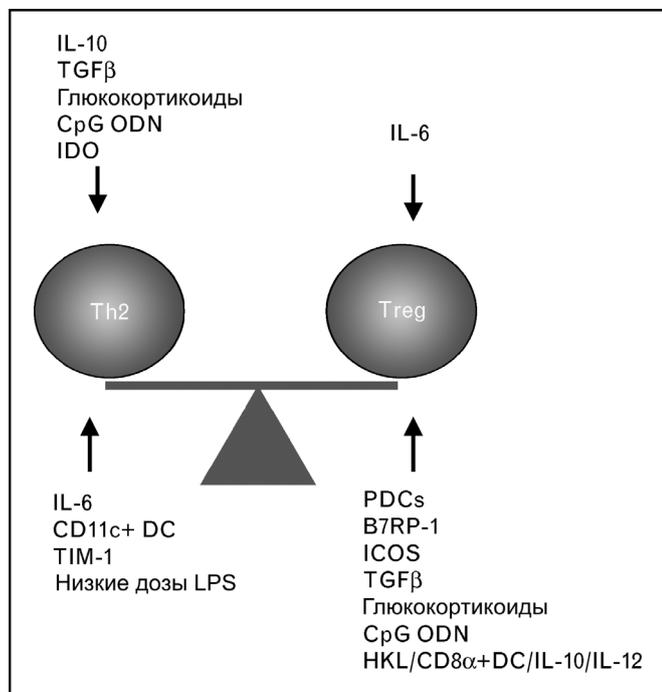


Рис. 9. Факторы, определяющие баланс между Th2-ответом и T-регуляторными клетками. Обозначения: PDC — плазмацитоидные дендритные клетки (по [18])

На схеме видно, что Th2-ответ усиливается IL-6, представлением антигена CD11<sup>c</sup> ДК, костимуляцией TIM-1 и низкодозовой экспозицией LPS (липополисахарид), тогда как IL-10, TGF- $\beta$ , глюкокортикоиды, CpG олигонуклеотиды (ODN), IDO подавляют экспрессию цитокинов Th2. Количество и активность Treg клеток увеличиваются под действием TGF- $\beta$  (отчасти через поддержку экспрессии Foxp3), костимуляции B7RP-1 и ICOS, плазмацитоидных ДК в дыхательном эпителии, глюкокортикоидов (которые повышают экспрессию Foxp3), ODN (они увеличивают активность IDO) и убитых нагреванием листерий (HKL). IL-6 снижает активность CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg клеток.

**5.6. Проблема гистогематических барьеров при АСИТ.** Барьерная функция слизистых и кожных покровов — отдельная большая и сложная проблема. Однако она важна в связи с поиском новых путей и средств введения аллергена при АСИТ, включая интраназальный, пероральный, эпикутанный (чрескожный) [98] и др. Следует при этом подчеркнуть значение накопленной

суммы знаний по ультраструктуре, цито- и биохимии этих наружных и внутренних выстилок организма, которые заставляют по-новому рассматривать устоявшиеся представления и оценить историческую преемственность в получении истинной информации. Работы последних лет показали, что именно здесь активируются местные дендритные клетки, регулируется стимулируемый цитокинами аллергенспецифический Th2-ответ и формируются механизмы периферической толерантности.

Особенно существенный прогресс достигнут в изучении роли межэпителиальных контактов: плотных контактов («tight junctions»); десмосом; зон сцепления, или промежуточных контактов (zonulae adherentes). Плотные контакты охватывают по периметру каждую эпителиальную клетку, запирая межклеточные пространства в поверхностной части на границе с внешней средой или просветом дыхательного или пищеварительного тракта. Их дефект открывает входные ворота для экзогенных веществ, включая аллергены. Десмосомы — это контакты, выполняющие функцию механической связи между клетками. Зоны сцепления представляют собой особый тип межклеточного соединения: они располагаются в базальной части эпителиальных клеток и опоясывают их лентами или образуют пункты прикрепления к внеклеточному матриксу.

Выявлены специфические белки этих контактных зон: кадгерин, десмоглеин, десмоколлин, винкулин, плакоглобин, филагрин и др. Продемонстрировано для респираторного эпителия, что ряд аллергенов (например, клещ домашней пыли) обладает протеазами и нарушает его барьерную функцию [76]. Есть факторы, провоцирующие повреждение барьера дыхательных путей: к ним относят вирусы, табачный дым (как показал Gangl K. et al., 2009 [цит. по: 76]) и др. Нарушение эпидермального барьера найдено при мутации гена филагрина, что способствует развитию атопического дерматита.

Однако помимо деталей ультраструктуры и биохимии барьерных тканей в контексте аллергии и АСИТ представляется не менее значимой общая концепция данной проблемы. Еще в 1970-е годы было высказано предположение о том, что нарушение проницаемости барьерных тканей для аллергенов является решающей формой предрасположенности к аллергии (Гущин И.С., 1976, 1979 [9, 10]). В последнее время это представление было развито в ряде публикаций [12]. Появились и многочисленные работы, которые подтверждают указанную идею на разных типах гистогематических барьеров [76].

## 6. Молекулярно-биологические основы диагностики, лечения и профилактики

Внедрению новейших молекулярно-биологических методов при АСИТ способствовали поиски надежных методов стандартизации аллергенов. Безусловно, важным этапом здесь явилось получение рекомбинантных аллергенов [74, 82, 106, 109]. Последовательность исторических событий в этой области выглядит таким образом. В 1988–1989 гг. были клонированы кДНК аллергенов (главный аллерген яда пятнистой осы, главный аллерген клеща домашней пыли *Der p 1*, главный аллерген березовой пыльцы *Bet v 1*). В начале 1990-х годов рекомбинантные аллергены стали применять для диагностики *in vitro*. Далее предложили использовать рекомбинантные гипоаллергены у пациентов при осуществлении провокационного теста. В начале 2000-х годов были проведены первые контролируемые исследования АСИТ с помощью рекомбинантных аллергенов: сперва на гипоаллергенах, а затем на аллергенах дикого типа. Принципиальным фактом представляется четкое обнаружение индукции аллергенспецифических IgG антител, тормозящих немедленное и хроническое аллергическое воспаление. Начиная с 2008 г. рекомбинантные аллергены служат как референс-материалы для аллергенных продуктов (особенно это касается главных аллергенов). К числу реальных достижений здесь надо отнести также итоги реализации проекта ЕС «CREATE», благодаря чему удалось рекомендовать три аллергена в качестве международных референс-стандартов: *rBet v 1*, *rPhl p 5a*, *rDer p 2*. В 2006–2010 гг. были осуществлены исследования влияния СЛИТ с использованием рекомбинантных аллергенов, однако требуются дальнейшие широкомасштабные исследования эффективности и безопасности.

Таким образом, к настоящему времени разработана современная технология производства рекомбинантных молекул из основных аллергенов для клинического использования — диагностики и лечения (рис. 10).

На рисунке 10 представлена схема, иллюстрирующая получение рекомбинантных продуктов на основе структуры генов естественных аллергенов (пыльца, пища, перхоть животных, яд перепончатокрылых, клещ домашней пыли, плесень).

Определенную нишу занимают производство и применение МАТ к IgE, например, препарата омализумаб — это гуманизированные моноклональные антитела, полученные на основе рекомбинантной ДНК. Данный препарат представляет собой IgG1 каппа антитело на человеческой структурной основе с участками мышиного

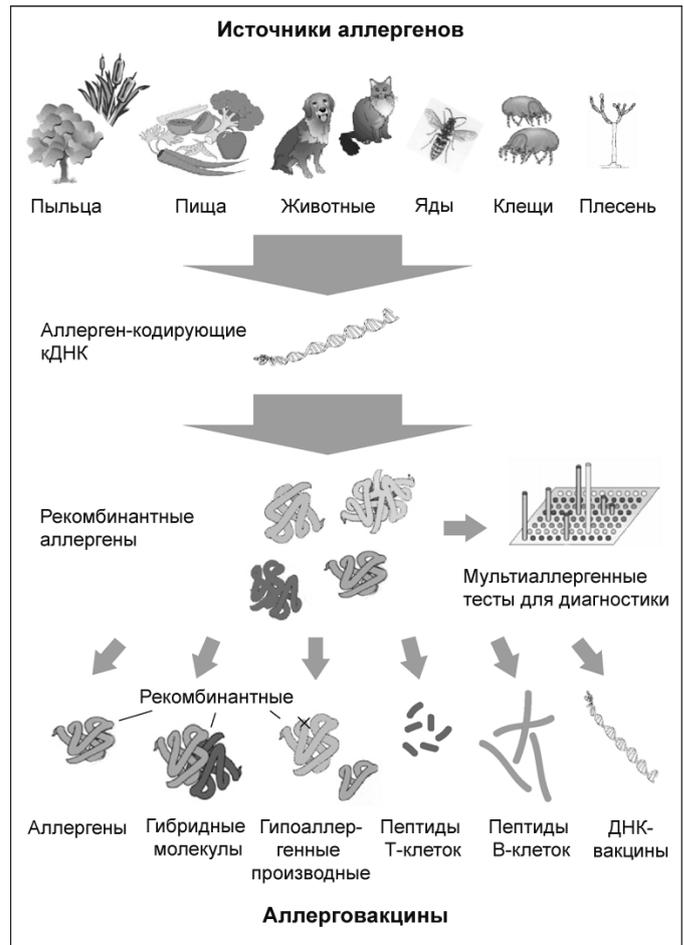


Рис. 10. Использование рекомбинантных аллергенов для диагностики и терапии (по [74])

антитела, связывающего IgE. В комплексе с АСИТ применяется и ряд эффективных фармпрепаратов, включая антигистаминные.

## 7. Будущее АСИТ

Прогнозированию развития метода АСИТ посвящен ряд работ [19, 37, 108]. К числу существенных прорывов в АСИТ в будущем относится создание рекомбинантных аллерговакцин. Стратегическая линия на разработку ДНК-вакцин была принята с 1995 года, причем в отношении многих аллергенов, включая респираторные, пищевые и яды жалящих насекомых. Будут реализовываться подходы, основанные на использовании кДНК, плазмид, репликонов. Это позволит решить многие проблемы, связанные с применением естественных аллергенов, например, их низкое качество, слабая иммуногенность и др. Ставится также цель изготовить белки слияния, состоящие из вирусных белков-носителей и пептидов, приготовленных из аллергенов без аллергенной активности, что даст возможность избавиться от

побочных реакций и предложить указанный комплекс для профилактической вакцинации [107].

Другим важным направлением перспективных исследований является разработка синтетических пептидов [71], представляющих Т-клеточные эпитопы аллергенов и аутоантигены. Равным образом это относится и к пептидам, содержащим В-клеточный эпитоп.

По-прежнему будет уделяться внимание очистке рекомбинантных аллергенов, приготовлению гипоаллергенных изоформ. Ведется разработка вопросов генетической иммунизации — использования иммуностимулирующих CpG-мотивов.

Придается значение различным комбинациям вводимых субстанций, среди них наиболее значимы [31]:

- смесь нескольких главных рекомбинантных аллергенов;
- слияние главных аллергенов;
- пептиды или полимеры главных аллергенов;
- химерические аллергены;
- фрагменты или свернутые (folding) варианты рекомбинантных аллергенов;
- сочетание обычной АСИТ с антиIgE антителами.

Приоритетная роль отводится и новым формам адъювантов, призванных снижать дозу вводимого аллергена без уменьшения клинического эффекта. Здесь предлагают использовать адъюванты, приготовленные из бактериальных оболочек, и ДНК-адъюванты [32]. Хорошо зарекомендовал себя выделенный из бактерий монофосфорил-липид А (MPLA), являющийся нетоксичным, хорошо переносимым и способным вызывать выраженный Th1 ответ у человека. Среди потенциальных адъювантов выделяют ДНК прокариот, которая распознается Toll-подобным рецептором 9: уже получен ДНК-конъюгированный аллерген Amb a 1, находящийся в фазе II клинических испытаний.

В целом АСИТ будущего видится как метод, кроме действия на поллинозы, аллергию на клеща домашней пыли, перхоть животных и яды жалящих насекомых, расширяющий свои возможности на пищевую аллергию, латексную аллергию и атопический дерматит. Параллельно ставится задача дальнейшей диверсификации путей введения аллергена: помимо традиционных СКИТ и СЛИТ, чрескожный, интралимфатический, использование липосом, мукоадгезивных веществ и др.

## 8. Заключение

Представленные материалы наглядно свидетельствуют о том, насколько глубоко молекулярно-

биологический подход позволяет проникнуть в понимание сущности самого аллергического процесса и способов воздействия на него, в частности, с помощью АСИТ.

Еще раз надо подчеркнуть основную идею относительно механизма АСИТ — это модификация входным сигналом (аллергеном) реакции иммунной системы в том же самом организме, который ранее выработал аллергический способ реактивности на такой же аллерген, только воздействовавший в другом дозовом и временном режиме. Фактически это означает признание «чужого» антигена «своим», то есть собственно толерантность в прямом смысле слова. Происходит внутренне присущее адаптивное действие, процесс «интернализации» экзогенного агента на предсуществующем структурно-функциональном модуле иммунной системы (по Н.К. Йерне). Следовательно, вопрос сводится не к изучению прямого влияния аллергена на отдельные элементы (звенья) аллергического ответа (что часто используется авторами в аналитическом аспекте), а к исследованию обычных в медико-биологическом эксперименте зависимостей «доза-эффект», «стимул-реакция», «вход-выход» и т.д. В связи с этим на первый план выходит проблема преодоления аллергеном барьера [13] с последующим взаимодействием с АПК и запуском системного механизма, заключающегося в последовательности клеточно-молекулярных процессов, функционирующих по патофизиологическим канонам. К тому же следует признать, что в случае применения АСИТ речь не идет о полном излечении, а о видоизменении заболевания и повышении адаптационного потенциала против его прогрессирования.

В завершение настоящей статьи следует указать на то, что она выходит в свет в год 100-летия со времени открытия метода АСИТ. Вполне естественен отклик мировой печати на эту дату [46, 89], который чаще всего формален по существу, без глубокого анализа вековой динамики развития метода. Тем не менее хочется обратить внимание на публикацию S. Durham et al. (2010) — известного английского специалиста, фактического прямого «правообладателя» выдающегося наследия своих соотечественников Л. Нуна и Дж. Фримена, работающего в том же историческом месте Лондона (Imperial College), в котором трудились и они. Статья вышла под весьма символическим названием «Сто лет аллергеной иммунотерапии: пора звонить в колокола об изменениях», предопределившим ее концовку, в которой говорится о необходимости модернизации методологии в связи с чрезмерной диспропорцией между традиционным подходом в виде СКИТ и новыми прогрессивными методами, в

частности, СЛИТ: «Новые подходы, включая сублингвальный путь, который позволяет достичь эффективной толерантности, безопасен, более удобен и превосходит по критерию «цена-эффективность», требуют активной поддержки и дальнейшего развития, а не продолжающаяся приверженность к традиционной подкожной иммунотерапии с ее известными ограничениями» [43, р. 5].

## Литература

1. Воробьева О.В. К 100-летию со дня рождения выдающегося иммунолога Нильса Йерне // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2011. – Т. 7. – № 2. – С. 63–72.
2. Воробьева О.В. К 50-летию вручения Нобелевской премии Бернету и Медавару за открытие приобретенной иммунологической толерантности // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2010. – Т. 6. – № 4. – С. 68–75.
3. Воробьева О.В., Гуцин И.С. Исторические предпосылки создания метода аллергенспецифической терапии (к 100-летию открытия) // Рос. Аллергол. Журн. – 2010. – № 5. – С. 17–28.
4. Воробьева О.В., Гуцин И.С. Контролируемые исследования эффективности и безопасности аллергенспецифической иммунотерапии: исторический аспект // Рос. Аллергол. Журн. – 2011. – № 4. – С. 3–14.
5. Воробьева О.В., Гуцин И.С. Развитие метода аллергенспецифической иммунотерапии в 20–60-х годах XX века – до обнаружения IgE // Рос. Аллергол. Журн. – 2011. – № 2. – С. 3–12.
6. Гуцин И.С. Аллерген-специфическая иммунотерапия (гипосенсибилизация) // Лечащий врач. – 2001. – № 3. – С. 4–12.
7. Гуцин И.С. Аллергия: аллергены, индукция и регуляция синтеза IgE // Патол. физиол. и эксп. тер. – 1999. – № 1. – С. 24–32.
8. Гуцин И.С. Индукция и регуляция синтеза IgE / В кн.: Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии. Сб. трудов 2-го Национального конгресса РААКИ. Москва, 21–24 сентября 1998 г. – М., 1998. – С. 81–103.
9. Гуцин И.С. Немедленная аллергия клетки. – М.: Медицина, 1976. – 175 с.
10. Гуцин И.С. Об элементах биологической целесообразности аллергической реактивности // Пат. физиол. – 1979. – № 4. – С. 3–11.
11. Гуцин И.С. Физиология иммуноглобулина Е (IgE) // Аллергология и иммунология. – 2000. – Т. 1. – № 1. – С. 76–87.
12. Гуцин И.С. Эпидермальный барьер и аллергия // Рос. Аллергол. Журн. – 2007. – № 2. – С. 3–16.
13. Гуцин И.С., Курбачева О.М. Аллергия и аллергенспецифическая иммунотерапия. – М.: Фармарус Принт-Медиа, 2010. – 228 с.
14. Иммуноглобулин Е: структура, продукция, биологические эффекты и диагностическое использование // Аллергология. – 1998. – № 2. – Передовая статья.
15. Ярилин А.А. TSLP (лимфопоэтин из стромы тимуса) – новый патогенетический фактор аллергии // Рос. Аллергол. Журн. – 2008. – № 5. – С. 9–13.
16. Ярилин А.А. Молекулярные основы межклеточной кооперации при иммунном ответе / В кн.: Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии. Сб. трудов 2-го Национального конгресса РААКИ. Москва, 21–24 сентября 1998 г. – М., 1998. – С. 59–80.
17. Ярилин А.А., Донецова А.Д. Регуляторные Foxp3<sup>+</sup>-Т-клетки и их роль при аллергии // Рос. Аллергол. Журн. – 2005. – № 2. – С. 22–26.
18. Ahern D.J. & Robinson D.S. Regulatory T cells as a target for induction of immune tolerance in allergy // Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology. – 2005. – Vol. 5. – P. 531–536.
19. Akdis C.A. Future of allergen-specific immunotherapy // Expert Opin. Emerg. Drugs. – 2005. – Vol. 10(1). – P. 1–4.
20. Akdis C.A., Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells // J. Allergy Clin. Immunol. – 2009. – Vol. 123. – P. 735–746.
21. Akdis C.A., Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy // J. Allergy Clin. Immunol. – 2011 Jan. – Vol. 127(1). – P. 18–27.
22. Akdis C.A., Barlan I.B., Bahceciler N., Akdis M. Immunological mechanisms of sublingual immunotherapy // Allergy. – 2006. – Vol. 61 (Suppl. 81). – P. 11–14.
23. Akdis C.A., Blaser K. IL-10-induced anergy in peripheral T-cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy // FASEB J. – 1999. – Vol. 13. – P. 603–609.
24. Akdis C.A., Blaser K. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy // Allergy. – 2000. – Vol. 55. – N 6. – P. 522–530.
25. Akdis C.A., Blaser K., Akdis M. Genes of tolerance // Allergy. – 2004. – Vol. 59. – N 9. – P. 897–913.
26. Akdis C.A., Blaser K., Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy // Chem. Immunol. Allergy. – 2006. – Vol. 91. – P. 195–203.
27. Akdis C.A., Blesken T., Akdis M., Wuethrich B., Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy // J. Clin. Invest. – 1998. – Vol. 102. – N 1. – P. 98–106.
28. Akdis M. Immune tolerance in allergy // Curr. Opin. Immunol. – 2009. – Vol. 21. – N 6. – P. 700–707.
29. Akdis M., and Akdis C.A. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy // J. Allergy Clin. Immunol. – 2007. – Vol. 119. – N 4. – P. 780–789.

30. Akdis M., Blaser K., Akdis C.A. T regulatory cells in allergy: Novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2005. – Vol. 116. – N 5. – P. 961–968.
31. Akkoc T., Akdis M., and Akdis C.A. Update in the mechanisms of allergen-specific immunotherapy // *Allergy Asthma Immunol. Res.* – 2011. – Vol. 3(1). – P. 11–20.
32. Allergen-specific immunotherapy / In: WAO White Book on Allergy, Section 4.3, 2011. – P. 110–116.
33. Bennich H., Ishizaka K., Johansson S.G.O., Rowe D.S., Stanworth D.R., Terry W.D. Immunoglobulin E, a new class of human immunoglobulin // *Bull. World Health Organ.* – 1968. – Vol. 38. – P. 151–152.
34. Black C.A. A brief history of the discovery of the immunoglobulins and the origin of the modern immunoglobulin nomenclature // *Immunology and Cell Biology.* – 1997. – Vol. 75. – P. 65–68.
35. Calderon M.A., Larenas D., Kleine-Tebbe J. et al. European Academy of Allergy and Clinical Immunology task force report on «dose-report relationship in allergen-specific immunotherapy» // *Allergy.* – 2011 Oct. – Vol. 66. – N 10. – P. 1345–1359 (DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02669.x>).
36. Canonica G.W., Bousquet J., Casale T., Lockey R.F. et al. Sub-lingual immunotherapy: World Allergy Organization Position Paper 2009 // *Allergy.* – 2009 Dec. – Vol. 64 – Suppl. 1. – P. 1–59 (см. также: WAO Journal. – November 2009. – P. 233–281).
37. Carnes J., Robinson D.S. New strategies for allergen immunotherapy // *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* – 2008. – Vol. 2(2). – P. 92–101.
38. Ciprandi G., Marseglia G.L., Tosca M.A. Allergen-specific immunotherapy: an update on immunological mechanisms of action // *Monaldi archives for chest disease.* – 2006. – Vol. 65. – N 1. – P. 34–37.
39. Ciprandi G. et al. Sublingual immunotherapy affects specific antibody and TGF-beta serum levels in patients with allergic rhinitis // *Int. J. Immunopathol.* – 2009. – Vol. 22. – P. 1089–1096.
40. Clinical immunology – Guidelines for its organization, training and certification. Relationships with allergology and other disciplines. A WHO/IUIS/IAACI // *Allergy and Clinical Immunology News.* – 1993. – Vol. 5. – P. 22–30.
41. Creticos P.S., and Lichtenstein L.M. Immunotherapy for allergic disease: a four-decade investigation // *Clin. & Exp. Reviews.* – 2009. – Vol. 4(2). – P. 224–228.
42. De Weck A.L. Аллергия и клиническая иммунология в XXI веке. Потенциальные возможности Международной ассоциации по аллергологии и клинической иммунологии (IAACI) и недавно созданной Всемирной ассоциации по аллергии (WAO) // *Аллергология и иммунология.* – 2000. – Т. 1. – № 3. – С. 5–12.
43. Durham S. & Leung D. One hundred years of allergen immunotherapy: Time to ring changes // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2010. – Vol. 127. – P. 3–7.
44. Durham S.R. et al. Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon-gamma // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 1996. – Vol. 97. – P. 1356–1365.
45. Durham S.R. et al. Long-term clinical efficacy of grass pollen immunotherapy // *N. Engl. J. Med.* – 1999. – Vol. 341. – P. 468–475.
46. Durham S.R., Nelson H. Allergen immunotherapy: a centenary celebration // *World Allergy Organization Journal.* – 2011. – Vol. 4. – N 6. – P. 104–106.
47. Ebner C. et al. Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen // *Clin. Exp. Allergy.* – 1997. – Vol. 27. – P. 1007–1015.
48. Flicker S., Valenta R. Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2003. – Vol. 132(1). – P. 13–24.
49. Focke M., Swoboda I., Marth K., Valenta R. Developments in allergen-specific immunotherapy: from allergen extracts to allergy vaccines bypassing allergen-specific immunoglobulin E and cell reactivity // *Clin. Exp. Allergy.* – 2010. – Vol. 40(3). – P. 385–397.
50. Gleich G.J. et al. Effect of immunotherapy on immunoglobulin E and G antibodies to ragweed antigens: a six-year prospective study // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 1982. – Vol. 70. – P. 261–271.
51. Gross F., Metzner G., Behn U. Mathematical modeling of allergy and specific immunotherapy: Th1-Th2-Treg interactions // *J. Theor. Biol.* – 2011. – Vol. 269(1). – P. 70–78.
52. Gushyshin I.S. Allergen-specific immunotherapy // *Int. J. Immunorehabilitation.* – 1997. – Vol. 7. – P. 68–78.
53. Hamilton R.G. Human immunoglobulins / In: *Handbook of Human Immunology.* 2<sup>nd</sup> ed. M.R.G. O’Gorman and A.D. Donnerberg (Eds.). Chapter 3. – CRS Press, 2008. – P. 63–106.
54. Heremans J.F., Heremans M-Th., Schultz H.E. Isolation and description of a few properties of the beta2A-globulin of human serum // *Clin. Cim. Acta.* – 1959. – Vol. 4. – P. 96–102.
55. Immunoglobulin E [Электронный ресурс]: <http://en.wikipedia.org/wiki/IgE> (Дата обращения – 22.02.2010).
56. Incorvaia C., Riario-Sforza G.G., Incorvaia S., and Frati F. Sublingual immunotherapy in allergic asthma: Current evidence and needs to meet // *Ann. Thorac. Med.* – 2010. – Vol. 5(3). – P. 128–132.

57. *Ishizaka K. and Ishizaka T.* Identification of gammaE antibodies as a carrier of reaginic activity // *J. Immunol.* – 1967. – Vol. 99. – N 6. – P. 1187–1198.
58. *Ishizaka K., Ishizaka T. and Hornbrook M.M.* Physico-chemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with gammaE globulin antibody // *J. Immunol.* – 1966. – Vol. 98. – P. 840–853.
59. *Ishizaka K., Ishizaka T., Hornbrook M.M.* Blocking of Prausnitz-Kuestner sensitization with reagin by normal human beta2A-globulin // *J. Allergy.* – 1963. – Vol. 34. – P. 395–403.
60. *Ishizaka K., Ishizaka T., Hornbrook M.M.* Physico-chemical properties of reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as carrier of reaginic activity // *J. Immunol.* – 1966. – Vol. 97. – N 1. – P. 75–85 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4162440>).
61. *James L.K., Durham S.R.* Update on mechanisms of allergen injection immunotherapy // *Clinical & Experimental Allergy.* – 2008. – Vol. 38. – N 7. – P. 1074–1088.
62. *Johansson S.G.* Discovery and development of IgE assays // *Clin. Exp. Allergy.* – 1997. – Vol. 27(Suppl. 1). – S60–S63.
63. *Johansson S.G.O.* Milestones in understanding allergy and its diagnosis // *Clin. Exp. Allergy Rev.* – 2002. – Vol. 2. – N 1. – P. 2–7.
64. *Johansson S.G.O.* Raised levels of a new immunoglobulin class (IgND) in asthma // *Lancet.* – 1967. – N 2. – P. 951–953.
65. *Johansson S.G.O.* The history of IgE: from discovery to 2010 // *Curr. Allergy Asthma Rep.* – 2011. – Vol. 11. – N 2. – P. 173–177.
66. *Johansson S.G.O., Bennich H.* Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin // *Immunology.* – 1967. – Vol. 13(4). – P. 381–394.
67. *Johansson S.G.O., Bennich H.* Studies on a new class of immunoglobulin. I. Immunological properties / In: Killander J. (Ed.). Nobel Symposium 3. Gamma globulin structure and control of biosynthesis. – Stockholm: Almquist and Wiksell, 1967. – P. 193–197.
68. *Jutel M. & Akdis C.A.* Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy // *Allergy.* – 2011. – Vol. 65(6). – P. 725–732.
69. *Jutel M., Akdis C.A.* T-cell regulatory mechanisms in specific immunotherapy // *Chem. Immunol. Allergy.* – 2008. – Vol. 94. – P. 158–177.
70. *Jutel M., Akdis M., Blaser K., Akdis C.A.* Mechanisms of allergen specific immunotherapy – T-cell tolerance and more // *Allergy.* – 2006. – Vol. 61(7). – P. 796–807.
71. *Larche M.* Peptide therapy for allergic diseases: basic mechanisms and new clinical approaches // *Pharmacol. Ther.* – 2005. – Vol. 108(3). – P. 353–361.
72. *Larche M., Akdis C.A., Valenta R.* Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy // *Nat. Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 6(10). – P. 761–771.
73. *Lieberman P.L., Kaliner M.A., Lockey R.F., Simons F.E.* The allergy archives: pioneers and milestones // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2006. – Vol. 117(2). – P. 478–482.
74. *Linhardt B. and Valenta R.* Molecular design of allergy vaccines // *Current Opinion in Immunology.* – 2005. – Vol. 17. – P. 1–10.
75. *Liu G., Zhao Y.* Toll-like receptors and immune regulation: their direct or indirect modulation on regulatory CD4+CD25+ T cells // *Immunology.* – 2007. – Vol. 122. – P. 149–156.
76. *Mattila P., Joenvaara S., Renkonen J., Toppila-Salmi S. and Renkonen R.* Allergy as an epithelial barrier disease // *Clinical and Translational Allergy.* – 2011. – Vol. 1:5 (<http://www.ctajournal.com/content/1/1/5>).
77. Mechanisms of immunotherapy / In: Allergen immunotherapy: A practical parameter second update. Cox L. (Ed.). James T.L., Nelson N., Lockey R. (Co-Eds.) // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2007. – Vol. 120. – N 3. – S38.
78. Mechanisms of immunotherapy / In: Allergen immunotherapy: therapeutic vaccine for allergic diseases: Pt. 3. WHO Position Paper. Geneva, January 27–29 1997. – P. 10–12.
79. *Meiler F., Zumkehr J., Klunker S., Ruckert B., Akdis C.A., Akdis M.* In vivo switch to IL-10 secreting T regulatory cells in high-dose allergen exposure // *J. Exp. Med.* – 2008. – Vol. 295. – P. 2887–2898.
80. *Moingeon P. et al.* Immune mechanisms of allergen-specific immunotherapy // *Allergy.* – 2006. – Vol. 61. – N 2. – P. 151–165.
81. *Nandakumar S., Miller Ch.W.T. and Kumaraguru U.* T regulatory cells: an overview and intervention techniques to modulate allergy outcome // *Clin. Mol. Allergy.* – 2009. – Vol. 7. – N 5 doi:10.1186/1476-7961-7-5 (<http://www.clinicalmolecularallergy.com/content/7/1/5>).
82. *Nierenberger V. and Valenta R.* Recombinant allergens for immunotherapy. Where do we stand? // *Current Opinion in Allergy and Clin. Immunol.* – 2004. – Vol. 4. – P. 549–554.
83. *Norman Ph.S.* A review of immunotherapy // *Allergy.* – 2007. – Vol. 33. – N 2. – P. 62–70.
84. *Novak N., Bieber T. & Allam J.P.* Immunological mechanisms of sublingual allergen-specific immunotherapy // *Allergy.* – 2011. – Vol. 65(6). – P. 733–739.
85. *O’Hehir R.E., Sandrini A., Anderson G.P., Rolland J.M.* Sublingual allergen immunotherapy: immunological mechanisms and prospects for refined vaccines // *Curr. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 14(21). – P. 2235–2244.
86. *Passalacqua G., Compalati E., Canonica G.W.* Advances in allergen-specific immunotherapy // *Curr. Drug Targets.* – 2009 Dec. – Vol. 10(12). – P. 1255–1262.
87. *Pate M.B., Smith J.K., Chi D.S., Krishnaswamy G.* Regulation and dysregulation of immunoglobulin E: a molecular and clinical perspective // *Clinical and Molecular Allergy.* – 2010. – Vol. 8. – N 3. – 13 p. (<http://www.clinicalmolecularallergy.com/content/8/1/3>).

88. *Rak S. et al.* The effect of immunotherapy on eosinophil accumulation and production of eosinophil chemotactic activity in the lung of subjects with asthma during natural pollen exposure // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 1991. – Vol. 88. – P. 878–888.
89. *Ring J., Guterth J.* 100 years of hyposensitization: history of allergen-specific immunotherapy (ASIT) // *Allergy.* – 2011 June. – Vol. 66. – N 6. – P. 713–724.
90. *Robinson D.S.* Allergen immunotherapy: does it work and, if so, how and for how long? // *Thorax.* – 2000. – Vol. 55(Suppl. 1). – P. S11–S14.
91. *Rocklin R.E. et al.* Generation of antigen-specific suppressor cells during allergy desensitization // *N. Engl. J. Med.* – 1980. – Vol. 302. – P. 1213–1219.
92. *Rolland J.M., Gardner L.M., O’Hehir R.E.* Allergen-related approaches to immunotherapy // *Pharmacol. Ther.* – 2009. – Vol. 121(3). – P. 273–284.
93. *Rowe D.S., Fahey J.L.* A new class of immunoglobulin. I. A unique myeloma protein. II. Normal serum IgD // *J. Exp. Med.* – 1965. – Vol. 121. – P. 171–185.
94. *Scadding G., Durham S.R.* Mechanisms of sublingual immunotherapy // *Immunology and Allergy Clinics of North America.* – 2009. – Vol. 31. – N 2. – P. 191–209.
95. *Scadding G.W. et al.* Sublingual grass pollen immunotherapy is associated with increases in sublingual Foxp3-expressory cells and elevated allergen-specific immunoglobulin G4, immunoglobulin A and serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B-cells // *Clin. Exp. Allergy.* – 2010. – Vol. 40. – P. 598–606.
96. *Schmidt-Weber C.B. et al.* TH17 cells in the big picture of immunology // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2007. – Vol. 120. – P. 247–254.
97. *Schmidt-Weber C.B., Blaser K.* Immunological mechanisms in specific immunotherapy // *Springer seminars in immunopathology.* – 2004. – Vol. 25(3–4). – P. 377–390.
98. *Senti G., von Moos S. & Kuendig T.M.* Epicutaneous allergen administration: is this the future of allergen-specific immunotherapy? // *Allergy.* – 2011 June. – Vol. 66. – N 6. – P. 798–200.
99. *Shakir E.M., Cheung D.S., Grayson M.H.* Mechanisms of immunotherapy: a historical perspective // *Ann. Allergy, Asthma, Immunol.* – 2010. – Vol. 105. – N 5. – P. 340–347.
100. *Shamji M.H., Durham S.R.* Mechanisms of immunotherapy to aeroallergens // *Clin. Exp. Allergy. Special Issue: Special Centenary Edition on Immunotherapy.* – 2011 Sept. – Vol. 41. – N 9. – P. 1235–1246.
101. *Stanworth D.R.* Immunoglobulin E (reagin) and allergy // *Nature.* – 1971 Oct. – Vol. 133. – P. 310–316.
102. *Stanworth D.R.* Reaginic antibodies // *Advances in Immunology.* – 1963. – Vol. 3. – P. 181–260.
103. *Stanworth D.R.* The discovery of IgE // *Allergy.* – 2007. – Vol. 48. – N 2. – P. 67–71.
104. *Takai T. and Karasuyama H.* The study of allergy by Japanese researchers: a historical perspective // *Int. Immunol.* – 2009. – Vol. 21. – N 12. – P. 1311–1318.
105. *Till S.J., Francis J.N., Nouri-Aria K., Durham S.R.* Mechanisms of immunotherapy // *J. Allergy Clin. Immunology.* – 2004. – Vol. 113(6). – P. 1025–1034.
106. *Valenta R. et al.* Recombinant allergens. Steps on the way to diagnosis and therapy of type I allergy // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1996. – Vol. 409. – P. 185–196.
107. *Valenta R. et al.* Recombinant allergens: What does the future hold? // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2011 Apr. – Vol. 127(4). – P. 860–864.
108. *Valenta R.* The future of antigen specific immunotherapy of allergy // *Nature Reviews Immunology.* – 2002 June. – Vol. 2. – P. 446–453 ([www.nature.com/reviews/immunol.](http://www.nature.com/reviews/immunol/)).
109. *Valenta R., Linhart B., Swoboda I. & Niederberger V.* Recombinant allergens for allergen-specific immunotherapy: 10 years anniversary of immunotherapy with recombinant allergens // *Allergy.* – 2011. – Vol. 66(6). – P. 775–783 (DOI: 10.1111/j.1398-9995.2011.02565.x).
110. *Varney V.A. et al.* Influence of grass pollen immunotherapy on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen-induced late-phase cutaneous responses // *J. Clin. Invest.* – 1993. – Vol. 92. – P. 644–651.
111. *Zouali M.* Immunological tolerance: mechanisms / *Encyclopedia of life science.* – Nature Publishing Group, 2001. – P. 1–9 [Электронный ресурс]: <http://immuneweb.xxmu.edu.cn/reading/adative/8.pdf> (Дата обращения – 17.10.2011).
112. *Zouali M., Isenberg D. And Morrow J.W.W.* Idiotype network manipulation for autoimmune diseases: where we are going // *Autoimmunity.* – 1996. – Vol. 24. – P. 55–63.

## Список сокращений

АПК – антиген-представляющая клетка.  
АСИТ – аллергенспецифическая иммунотерапия,  
ДК – дендритные клетки,  
МАТ – моноклональное антитело,  
ПКИТ – подкожная иммунотерапия,  
СЛИТ – сублингвальная иммунотерапия,  
ЕААСИ – Euroean Academy of Allergy and Clinical Immunology,  
IFN – interferon (интерферон),  
IL – interleukin (интерлейкин),  
МНС – major histocompatibility complex (главный комплекс гистосовместимости),  
TGF- $\beta$  – transforming growth factor- $\beta$  (трансформирующий фактор роста- $\beta$ ),  
Th – T-helper (Т-клетка помощник – «хелпер»),  
Treg – Т-регуляторные клетки  
WAO – World Allergy Organization

## **MOLECULAR-BIOLOGICAL BASIS OF ALLERGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY**

O.V. VOROBYEVA, I.S. GUSHCHIN

*Institute of Immunology, Moscow, Russia*

This review addresses the historical aspects of molecular-biological basis and mechanisms of allergen-specific immunotherapy.  
*Keywords:* allergen-specific immunotherapy, cellular and molecular basis, mechanisms, allergens, genetic engineering, history.

## ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2011 ГОДА\*

## ПЕРСОНАЛИИ

К 80-летию со дня рождения академика РАН  
А.С. Спирина

4 сентября 2011 года исполнилось 80 лет со дня рождения Александра Сергеевича Спирина, академика РАН, крупного ученого, внесшего существенный вклад в формирование современной молекулярной биологии.

**Краткая биография.** А.С. Спирин родился в пос. Калинин (ныне г. Калининград) Московской области. Из семейной истории известен факт, что его отец учился во 2-й Казанской гимназии вместе с А.А. Баевым (будущим биохимиком, академиком АН СССР). По окончании биофака МГУ в 1954 году А.С. Спирин поступил в аспирантуру Института биохимии им. А.Н. Баха АН СССР. В 1957 г. он защитил кандидатскую диссертацию, в 1963 г. — докторскую. С 1962 года стал заведующим лабораторией Института биохимии им. А.Н. Баха АН СССР. В 1964 году получил звание профессора на кафедре биохимии растений МГУ, которую занимал его учитель А.Н. Белозерский. После его смерти А.С. Спирин с 1973 года возглавил эту кафедру, переименованную в кафедру молекулярной биологии, которой руководит и сейчас. С момента организации Пущинского научного центра он основал там Институт химии белка АН СССР (1967 г.) и стал его директором. В 1966 г. был избран членом-корреспондентом, в 1970 г. — действительным членом (академиком) АН СССР. Состоял членом Президиума АН СССР и РАН (1988—2001).

**Научные достижения.** Научный дебют А.С. Спирина в 1957 г. был ознаменован фундаментальным открытием в формировавшейся тогда молекулярной биологии: обнаружением у бактерий некодирующих РНК и ДНК-подобных РНК (то есть предсказанием информационной РНК). Это было сделано им совместно с А.Н. Белозерским. Результаты были опубликованы в 1957 году в двух русских журналах («Доклады АН СССР» и «Биохимия»), а в 1958 году были напечатаны в журнале «Nature», Vol. 182, p. 111–112 под названием «A correlation between the compositions of deoxyribonucleinic and ribonucleinic acids» (рис. 1). Фактически это стало крупным преемственным вкладом в «молекулярно-биологическую гонку» XX столетия, что своевременно было отмечено одним из главных ее участников — Ф. Криком, сказавшим, что указанная работа является «новой фазой в исследовании генетического кода». Кроме того, Ф. Крик в своей статье «Современное состояние проблемы кодирования» (опубликована в «Brookhaven Symp.», 1959, Vol. 12, p. 35–39) назвал результаты, приведенные в статье А.Н. Белозерского и А.С. Спирина, «крайне неожиданными». Это заставило его пересмотреть некоторые первоначальные положения центральной догмы молекулярной генетики и сделать выводы, что генетический код не универсален; большая часть ДНК бессмысленна, не кодирует белок и не образует РНК; генетический код вырожден, то есть имеются множественные пути для ДНК, чтобы кодировать одну и ту же аминокислоту. Однако процитированные скупые напечатанные слова только фиксировали внешнее официальное отношение к происшедшему. На самом же деле Крик с коллегами, как он сам вспоминал позднее, пережили состояние, близкое к шоку, от результатов русских исследователей. Эмоциональный накал, возможно, объяснялся еще и тем, что точные, достоверные, революционные по своей сути результаты по молекулярной генетике исходили из лысенковской России, бывшей тогда цитаделью неоламаркизма. Реакция также была вызвана тем, что Крик, вдохновленный своими беспрецедентными успехами в расшифровке строения ДНК, ожидал быстрого решения и на пути от ДНК к белку и построил упрощенные схемы, часть которых он взял от искрометных прозрений Гамова. Кстати, и другой знаменитый исследователь Дж. Уотсон всегда высоко ценил направление, разрабатываемое российским ученым: ему принадлежит высказывание: «Мне нравятся идеи, развиваемые академиком А.С. Спириным».

\* Материал подготовлен В.С. Воробьевым

Table 1. EFFECT OF IMPLANTATION OF A FRESH LARVAL BRAIN INTO EACH 'DAUER-PUPA' AT 25° C.

No. of 'Dauer-pupae' used as recipient	No. of dead individuals	No. of moths emerged	Days from implantation to emergence
15 (♀)	1	14	18-25*

\* Mean time from implantation to emergence, 20 days.

A fresh brain was implanted into the head of each 'Dauer-pupa', the 'Dauer-pupae' having been kept at 25° C. for 30 days after being deprived of their brains immediately following pupation. After the implantation, the pupae were kept at 25° C.

As shown in Table 1, 14 out of 15 pupae operated became moths during the period from the eighteenth to the twenty-fifth day after the implantation and one died after five days. No imaginal differentiation was observed in 15 'Dauer-pupae', in which no brain had been implanted although they were kept at 25° C. for 100 days after pupation.

It is concluded that the larval brain is as effective as the pupal brain in the imaginal differentiation of 'Dauer-pupa'.

In silkworm pupa, the brain hormone is elaborated in the neurosecretory cells of the brain and is released into the blood stream<sup>2</sup>. On the other hand, in the 4th and 5th larval stage the neurosecretory materials elaborated in the neurosecretory cells of the brain were released through two paths, one from the cell to the nervi corporis cardiaci through the axon of the A-cell, and the other from the cell to the blood stream through the cortex of the brain<sup>3</sup>. It is highly probable, therefore, that the secretory material released through the latter path is the brain hormone concerned with imaginal differentiation.

Thus it appears that even in the larval stage the secretion of the brain affects the prothoracic gland in *Bombyx mori*.

MASATOSHI KOBAYASHI

Sericultural Experiment Station,  
Suginami, Tokyo.  
April 30.

\* Kobayashi, M., *J. Sericult., Sci. Jap.*, 24, 389 (1955) (in Japanese with English summary).

† Kobayashi, M., *Bull. Sericult. Exp. Sta.*, 15, 181 (1957) (in Japanese with English summary).

‡ Kobayashi, M., and Kirimura, J., *Nature*, 181, 1217 (1958).

**A Correlation between the Compositions of Deoxyribonucleic and Ribonucleic Acids**

We have shown that the composition of the ribonucleic acid of bacterial cells does not depend upon the very considerable changes in composition of deoxyribonucleic acid found when profound reorganizations of the hereditary nature of intestinal bacteria occur<sup>1,2</sup>. The composition of deoxyribonucleic acid in different bacterial species belonging to various systematic groups was shown to vary widely (from the extreme AT-type to the highest GC-type); whereas that of ribonucleic acid from these species was shown to vary slightly, small differences being noted only between very diverse species<sup>3,4</sup>. Thus the greater part of the ribonucleic acid of the cell appeared to be independent of the deoxyribonucleic acid.

However, a certain correlation was found to exist. This correlation is expressed in a tendency towards

an increase in the ratio  $\frac{G+C}{A+U}$  in ribonucleic acid

when passing from the species with the smaller  $\frac{G+C}{A+T}$

ratio in their deoxyribonucleic acid to those with greater values of this ratio<sup>4</sup>.

We have studied the composition of the two nucleic acids applying methods<sup>1</sup> based on the mild alkali hydrolysis of the total bacterial mass (after removing acid-soluble substances) by means of a modified form of the method of Schmidt and Thannhauser. The composition of the ribonucleic acid was determined by paper chromatography of nucleotides; the composition of the deoxyribonucleic acid was determined by paper chromatography of bases. The eluates of spots were examined in the ultra-violet with a quartz spectrophotometer. Each result represents the mean of at least four single determinations in each of two parallel hydrolysates for each culture. The mean error of the mean values for nucleotides and bases presented in Tables 1 and 2 was not greater than 2 per cent. In both tables the species

Table 1. COMPOSITION OF BACTERIAL DEOXYRIBONUCLEIC ACIDS

Species	Bases (moles per cent)				Pu Py	G+T A+C	G+C A+T
	G	A	C	T			
<i>Clostridium perfringens</i>	15.8	34.1	15.1	35.0	1.00	1.03	0.45
<i>Staphylococcus pyogenes aureus</i>	17.3	32.3	17.4	33.0	0.98	1.01	0.53
<i>Pasteurella tularensis</i>	17.6	32.4	17.1	32.9	1.00	1.02	0.53
<i>Proteus vulgaris</i>	19.8	30.1	20.7	29.4	1.00	0.97	0.68
<i>Escherichia coli</i>	26.0	23.9	26.2	23.9	1.00	1.00	1.09
<i>Proteus morganii</i>	26.3	23.7	26.7	23.3	1.00	0.98	1.13
<i>Shigella dysenteriae</i>	26.7	23.5	26.7	23.1	1.01	0.99	1.15
<i>Salmonella typhosa</i>	26.7	23.5	26.4	23.4	1.01	1.00	1.13
<i>Salmonella typhimurium</i>	27.1	22.9	27.0	23.0	1.00	1.00	1.18
<i>Erwinia carotovora</i>	27.1	23.3	26.9	22.7	1.02	0.99	1.17
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	27.2	22.5	27.3	23.0	0.99	1.01	1.20
<i>Aerobacter aerogenes</i>	28.8	21.3	28.0	21.9	1.00	1.03	1.31
<i>Mycobacterium vadousum</i> Kras.	29.2	20.7	28.5	21.6	1.00	1.03	1.37
<i>Brucella abortus</i>	29.0	21.0	28.9	21.1	1.00	1.00	1.37
<i>Alcaligenes faecalis</i>	33.9	16.5	32.8	16.8	0.98	1.03	2.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33.0	16.8	34.0	16.2	0.99	0.97	2.03
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> BCG	34.2	16.5	33.3	16.0	1.03	1.01	2.08
<i>Sarcina lutea</i>	36.4	13.6	35.6	14.4	1.00	1.03	2.57
<i>Streptomyces griseus</i>	36.1	13.4	37.1	13.4	0.98	0.98	2.73

Abbreviations: G, guanine; A, adenine; C, cytosine; T, thymine; Pu, purine bases; Py, pyrimidine bases.

Table 2. COMPOSITION OF BACTERIAL RIBONUCLEIC ACIDS

Species	Bases (moles per cent)				Pu Py	G+U A+C	G+C A+U
	G	A	C	U			
<i>Clostridium perfringens</i>	29.5	28.1	22.0	20.4	1.36	1.00	1.06
<i>Staphylococcus pyogenes aureus</i>	28.7	26.9	22.4	22.0	1.25	1.03	1.05
<i>Pasteurella tularensis</i>	29.8	27.3	21.0	21.9	1.33	1.07	1.03
<i>Proteus vulgaris</i>	31.0	26.3	24.0	18.7	1.34	0.99	1.22
<i>Escherichia coli</i>	30.7	26.0	24.1	19.2	1.31	1.00	1.21
<i>Proteus morganii</i>	31.1	26.0	23.7	19.2	1.31	1.01	1.21
<i>Shigella dysenteriae</i>	30.4	25.9	24.4	19.3	1.29	0.99	1.21
<i>Salmonella typhosa</i>	30.8	26.1	24.0	19.1	1.32	1.00	1.21
<i>Salmonella typhimurium</i>	31.0	26.1	23.8	19.1	1.33	1.00	1.21
<i>Erwinia carotovora</i>	29.5	26.5	23.7	20.3	1.27	0.99	1.14
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	31.6	23.1	23.8	21.5	1.21	1.13	1.24
<i>Aerobacter aerogenes</i>	30.3	26.0	24.1	19.6	1.29	1.00	1.19
<i>Mycobacterium vadousum</i> Kras.	31.7	23.8	23.5	21.0	1.25	1.12	1.23
<i>Brucella abortus</i>	30.2	25.4	24.9	19.5	1.26	0.99	1.23
<i>Alcaligenes faecalis</i>	30.9	25.7	24.1	19.3	1.31	1.01	1.22
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31.6	25.1	23.8	19.5	1.31	1.05	1.24
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> BCG	33.0	22.6	26.1	18.3	1.25	1.05	1.45
<i>Sarcina lutea</i>	32.7	23.2	24.2	19.9	1.27	1.11	1.32
<i>Streptomyces griseus</i>	31.1	23.8	25.2	19.9	1.22	1.04	1.29

Abbreviations: G, guanylic acid; A, adenylic acid; C, cytidylic acid; U, uridylic acid; Pu, purine nucleotides; Py, pyrimidine nucleotides.

Рис. 1. Факсимиле статьи А.Н. Белозерского и А.С. Спирина, напечатанной в «Nature» в 1958 году

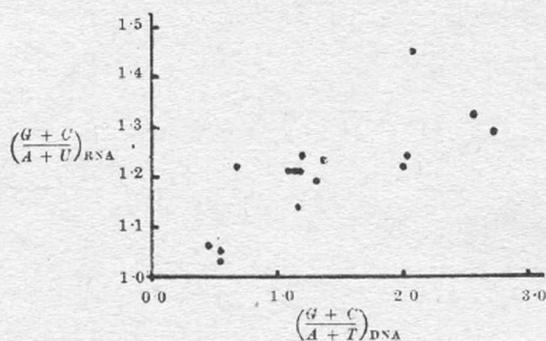


Fig. 1

are arranged in order of increase of the ratio  $\frac{G+C}{A+T}$  in their deoxyribonucleic acid. The details have been published elsewhere<sup>1</sup>.

The correlation is shown in Fig. 1, where the values of  $\left(\frac{G+C}{A+T}\right)_{DNA}$  are plotted against those of

$\left(\frac{G+C}{A+U}\right)_{RNA}$ , each point corresponding to a species

having characteristic values of the two ratios. There appears to be a positive correlation between the ratios

$\left(\frac{G+C}{A+U}\right)_{RNA}$  and  $\left(\frac{G+C}{A+T}\right)_{DNA}$  for the nineteen

bacterial species studied; the correlation coefficient is 0.72, with a mean error of 0.17; that is,  $r = +0.72 \pm 0.17$ . The correlation coefficient is thus 4.3 times as large as its mean error.

The fact that the value of regression of  $\left(\frac{G+C}{A+U}\right)_{RNA}$  on  $\left(\frac{G+C}{A+T}\right)_{DNA}$  is very small explains why one

encounters difficulties in studying the differences in composition of the ribonucleic acid of species differing drastically in the composition of their deoxyribonucleic acid.

It should be noted that the positive correlation between the compositions of the two nucleic acids has been established for only nineteen species of bacteria; further investigations are therefore necessary to show that this correlation is not fortuitous.

Nevertheless, our results suggest that part at least of the ribonucleic acid of the cell depends on the deoxyribonucleic acid, and that the two nucleic acids may even be similar with respect to their base compositions. On the other hand, the small value of the regression indicates that the greater part of the cell ribonucleic acid is relatively independent of the deoxyribonucleic acid.

A. N. BELOZERSKY  
A. S. SPTRIN

A. N. Bach Institute of Biochemistry,  
Academy of Sciences of the U.S.S.R.,  
Moscow.  
April 24.

<sup>1</sup> Spirin, A. S., and Belozersky, A. N., *Biokhimiya*, **21**, 768 (1956).

<sup>2</sup> Spirin, A. S., Belozersky, A. N., Kudlay, D. G., Skavronskaya, A. G., and Mitereva, V. G., *Biokhimiya*, **23**, 154 (1958).

<sup>3</sup> Spirin, A. S., and Belozersky, A. N., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, **113**, 650 (1957).

<sup>4</sup> Spirin, A. S., Belozersky, A. N., Shugaeva, N. V., and Vanjushin, B. F., *Biokhimiya*, **22**, 744 (1957).

### A Possible Mechanism for the Initial Transfer of the Genetic Code from Deoxyribonucleic Acid to Ribonucleic Acid

It is now a generally accepted hypothesis that deoxyribonucleic acid contains the genetic information in the living cell which ultimately directs the formation of protein. Moreover, there is some evidence that deoxyribonucleic acid acts as a template for the formation of ribonucleic acid which relays information to the protein polypeptide chain by another template mechanism. If this were so there should be a simple relation between the composition of ribonucleic and deoxyribonucleic acids, since there are only four commonly occurring base groups in each nucleic acid. The fact that this is not so is probably due to two factors: only a fraction of the nucleic acid in the cell functions as a template and, therefore, only this fraction would be pertinent when comparing base ratios of the two nucleic acids; there are several different templates (more than two) involved in the transfer of information from deoxyribonucleic acid to the polypeptide chain, and, as a result the general problem of information transfer might be more easily solved by consideration of each template and its immediate chemical product.

As an example of this approach, consider the relation between the two nucleic acids and concentrate on the ribonucleic acid that is most likely to be produced directly on the deoxyribonucleic acid. I shall assume that this is nuclear ribonucleic acid because of its close cytological connexion with deoxyribonucleic acid. Furthermore, a good deal of evidence has accumulated that the cell nucleus plays a crucial part in the metabolism of ribonucleic acid<sup>1</sup>.

This limitation makes it difficult to test any coding mechanism because of the paucity of pertinent data, for example, the base composition of deoxyribonucleic acid and nuclear ribonucleic acid. Nevertheless, I wish to propose the following code because it suggests further experiments. The data presented in Table 1 are taken from the results of Chargaff<sup>2</sup> and Vincent<sup>3</sup>.

Since deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid are each associated with four types of base groups, one might expect to find an immediate one-to-one correspondence between their respective bases. Chargaff's data do not verify this expectation however, and such a scheme is immediately discounted. The problem of finding four specific sites on deoxyribonucleic acid for binding ribonucleic acid has a possible solution resulting from the helical character of the duplex of the former which, in effect, gives rise to different binding sites being associated with a given nucleotide base-pair depending upon which polynucleotide chain the individual nucleotide members are situated. Thus adenine on chain I paired with thymine on chain II would make a different site from adenine on chain II and thymine on chain I. These two sites are designated as  $A-T$  I and  $A-T$  II. Likewise the other two sites are designated  $G-C$  I and  $G-C$  II. In this code each deoxyribonucleic acid base-pair functions as a location for one ribonucleic acid base-group in a single chain, the sequence of base-pairs in the latter being determined by the sequence of base-pairs in the former acid. The particular correspondence I would like to suggest is shown in Table 2.

(1) This code predicts a necessary relation between the base composition of the two nucleic acids such

После столь блестящего начала научной деятельности А.С. Спирина продолжил в 1960-е и последующие годы исследования уже самостоятельно, без своего учителя. Им был осуществлен цикл посвященных рибосомам работ, в которых был последовательно решен ряд кардинальных вопросов:

- формулирование основных принципов макромолекулярной структуры РНК (1959–1963 гг.);
- обнаружение структурного превращения рибосом — разворачивания в рибонуклеопротеидный тяж — и установление на этой основе принципа их строения (1963–1966 гг.);
- осуществление самосборки рибосом (1963–1966 гг.);
- открытие информосом (1964 г.);
- разработка модели молекулярного механизма функционирования рибосомы в процессе биосинтеза белка (1968 г.).

Существенным моментом явилось обнаружение совместно с Л.П. Гавриловой (1970–1974 гг.) возможности биосинтеза белка на структурно модифицированных рибосомах вне клетки (бесфакторный — «неэнзиматический» — синтез полипептидов). В дальнейшем это направление получило развитие и привело к разработке непрерывно-проточных и непрерывно-обменных систем бесклеточного синтеза белка, то есть нового типа экспрессии генов *in vitro*.

**Публикации.** А.С. Спирина принадлежит более 350 научных трудов. Среди них ключевые статьи в отечественных и зарубежных журналах, а также книги: Рибонуклеиновые кислоты. (Состав, строение и биологическая роль). М., 1964; Рибосома. 2-е изд. М., 1971 (соавт. Л.П. Гаврилова); Молекулярная биология: структура рибосомы и биосинтез белка. М., 1986 и др. Он — автор одних из лучших биографий и воспоминаний о своем учителе А.Н. Белозерском, позволяющих правильно понять и оценить вклад в науку этой выдающейся личности. Большое значение для современной жизни имеют его доклады, лекции, выступления в печати, обращения и интервью, в которых обнаруживается независимая объективная позиция и глубокий прогностический смысл.

**Звания и награды.** Естественно, что ученый такого класса удостоен высоких почестей. На родине — это два ордена Ленина, ордена «За заслуги перед отечеством» III и IV степени, Ленинская премия (1976), Государственная премия СССР (1986), Государственная премия РФ (2002). В 2001 году, в год его 70-летия А.С. Спирина была присуждена высшая награда Российской

академии наук — Большая золотая медаль им. М.В. Ломоносова. Знаки международного признания выразились в виде медали Ханса Кребса Федерации европейских биохимических обществ — ФЕБО (1969), членства в ряде академий и университетов: член Германской академии естествоиспытателей «Леопольдина» (1974), почетный доктор Гранадского университета (1972) и др.

Редколлегия и редсовет журнала «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» поздравляют Александра Сергеевича Спирина с юбилеем и желают крепкого здоровья и дальнейших творческих успехов.

## СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

### К 50-летию открытия генетического кода

Восемь лет назад мировая научная общественность широко отметила 50-летие открытия двойной спирали ДНК Дж. Уотсоном и Ф. Криком. И вот наступила очередная преемственная дата в истории молекулярной биологии — 50-летие открытия генетического кода.

Наш журнал уже отводил страницы для анализа исторической роли этого беспрецедентного события (Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова, 2007, Т. 3, № 3, С. 62–67; 2010, Т. 6, № 2, С. 72–73). Поэтому целесообразно, не входя в детали, оценить общую значимость указанной знаменательной даты. Важно при этом выдержать два аспекта: оценка в режиме реального времени (то есть современниками) и ретроспективные исторические оценки.

Ключевым исходным фактом для анализа является обнаружение открытия генетического кода. Как известно, это произошло в Москве в августе 1961 года на V Международном биохимическом конгрессе. Неожиданность и сенсационность происшедшего обуславливались тем, что об обнаружении генетического кода (триплетного кодирования синтеза полифенилаланина полиурацилом) доложил никому не известный молодой американский биохимик Маршалл Ниренберг. Поэтому личность первооткрывателя не довлела над самой сущностью разыгравшегося исторического акта. Ведь речь шла не о каком-то озарении ученого-одиночки, а об успехе коллективного разума всего человечества (об этом же впоследствии говорил и М. Ниренберг в своей Нобелевской речи).

Журналистский корпус, склонный к ассоциациям и броским аналогиям, искал подходящие эпитеты. Аме-

риканская пресса, скорее движимая патриотическим чувством на соревновательном фоне биполярного мира, ставила событие 1961 года — открытие генетического кода, по крайней мере, не ниже, а, возможно, и выше полета Гагарина в космос, состоявшегося в том же году. Другие толкователи подыскивали удачные метафоры: среди них наиболее подходящей оказалось сравнение с Розеттским камнем, позволившим расшифровать египетские иероглифы.

Не находилось в стороне и профессиональное сообщество биохимиков и молекулярных биологов. Великий испанец Северо Очоа, Нобелевский лауреат 1959 года, открывший фермент, синтезирующий РНК *in vitro*, подключился к разработке проблемы генетического кода с помощью собственной оригинальной методологии с использованием полинуклеотидфосфорилазы. Настойчивый, изобретательный индус Гобинд Корана вступил в борьбу за приоритет в полном раскрытии генетического кода, применяя методы прямого химического синтеза (ему удалось синтезировать короткие фрагменты РНК с заданной последовательностью, в том числе тринуклеотиды), чему он в совершенстве выучился еще во время стажировки у А. Тодда. Вступил в завершающую фазу обобщения своих идей о генетическом коде англичанин Фрэнсис Крик. И, наконец, не оставался безучастным и сам возмутитель спокойствия — Маршалл Ниренберг.

Результат был не менее ошеломляющим, чем волнующее событие 1961 года: через 5 лет, к 1966 году генетический код был полностью расшифрован для всех 20 аминокислот. Нобелевский комитет немедленно увенчал лидеров этого движения премией: она была присуждена в 1968 году М. Ниренбергу, Х. Коране, Р. Холли (последний расшифровал тРНК). Быстрота решения проблемы объяснялась неожиданной простотой принципа триплетности: специалисты 1950-х годов предсказали гораздо более долгий путь раскрытия этой одной из главных загадок центральной догмы молекулярной биологии. Приятно заметить, что русский ум внес в это коллективное творчество такую тонкую, своевременную ремарку о существовании некодирующих РНК и наличии ДНК-подобных РНК (речь идет о работах А.Н. Белозерского и А.С. Спирина 1957–1958 гг.).

Ретроспективная оценка с исторических позиций события 1961 года не представляет особого труда. находка М. Ниренберга (для точности и справедливости следует указать на то, что она сделана вместе с германским исследователем Г. Маттеи) стала необходимым преемственным звеном в последовательной цепи открытий, начиная с 1953 года, которая пришла

к своему логическому завершению в виде обнаружения возможности обратной транскрипции и рекомбинантности, что, в свою очередь, привело к генной инженерии, а к исходу XX века — к геномным и постгеномным технологиям.

### 50 лет со времени обнаружения мРНК

Второе не менее значимое юбилейное событие 2011 года связано с 50-летием открытия мРНК. К нему благодаря целенаправленному поиску шло несколько коллективов ведущих лабораторий мира. В результате так случилось в 1961 году, что сразу несколько имен оказались причастными к обнаружению ДНК-подобной РНК у бактерий. Это — Сидней Бреннер, Франсуа Жакоб, Жак Моно, Мэтью Месельсон, Франсуа Гро, Джеймс Уотсон, Брюс Спигелман. Через 2–3 года аналогичная РНК была найдена у различных эукариот. Два человека из указанной группы — Ф. Жакоб и Ж. Моно — спустя 4 года, в 1965 г. были удостоены Нобелевской премии (совместно с А. Львовым) «за открытия, касающиеся генетической регуляции синтеза ферментов и вирусов», а конкретно — за описание информационной РНК (или мРНК — авторы называли ее мессенджер-РНК, то есть РНК-посредник), механизмов экспрессии и транскрипции генов (в журнале «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова», 2010, Т. 6, № 1, С. 65–69, помещалась информация об этом событии). Ныне представление о мРНК стало классическим и вошло в руководства и учебники.

Однако в связи со знаменательной датой принято анализировать исторические предпосылки того или иного открытия. В отношении мРНК обычно в первую очередь вспоминают об американских исследователях Элиоте Волкине и Лазаре Астрахане, которые первыми высказали идею о существовании минорной короткоживущей фракции РНК и выделили ее из бактериофага T2, инфицирующего *E. coli*. Статья об этом вышла в свет в «Journal of Virology» (1956). В 1960 году минорную фракцию РНК выделили из дрожжей Мартинас Ичас и У.С. Винсент (публикация в PNAS).

Следует также отметить, что в ряду предшественников первооткрывателей мРНК стоят имена и отечественных исследователей А.Н. Белозерского и А.С. Спирина, которые в 1957–1958 гг. предсказали возможность существования мРНК (публикации на русском языке в центральных отечественных журналах и на английском — в журнале «Nature, 1958).

## СОБЫТИЯ ВТОРОЙ ПОЛОВИНЫ 2011 ГОДА

**Конференция****«IUFRO Tree Biotechnology Conference 2011»  
(Багия — Бразилия, — 26 июня — 2 июля 2011 г.)**

**26 июня — 2 июля 2011 года** в г. Багия (Бразилия) состоялась очередная конференция «IUFRO Tree Biotechnology Conference 2011» («Tree Biotech 2011»). Конференция проводится IUFRO — International Union of Forestry Research Organizations. Она проходит регулярно через 2 года. Уже проведено более 20 конференций в разных местах земного шара: Канада, Южная Африка, Швеция, США, Великобритания, Португалия и др. Нынешняя конференция проходила под девизом «От геномов — к интеграции и поставке продукции». В работе приняли участие 340 специалистов. В течение семи дней было заслушано 26 лекций, проведено 52 симпозиума и круглых стола, состоялись постерные сессии с 186 стендовыми сообщениями. Вышли в свет материалы конференции с 274 статьями. С большим успехом прошел симпозиум по геномной селекции в лесоразведении, который привлек более 100 участников. Состоялась также пленарная сессия, посвященная роли геномики в лесной биотехнологии.

**Конгресс биотехнологов  
«BIO 2011 International Convention»  
(Вашингтон, 27—30 июня 2011 г.)**

**27—30 июня 2011 года** в Вашингтоне (США) состоялся очередной представительный биотехнологический форум «BIO 2011 International Convention». В его работе приняло участие более 15000 специалистов из 48 штатов США и 65 стран. Наиболее крупные делегации были представлены от Канады, США, Германии, Франции, Кореи, Бельгии, Китая, Японии, Испании и Австралии. В выставке общей площадью около 17000 кв. м участвовали 1800 экспонентов. Мероприятие посетили государственные деятели (в их числе 11 губернаторов США, бывший премьер-министр Великобритании Тони Блэр и др.), высокие гости королевских кровей. Президент «BIO» Джим Гринвуд отметил большой успех «BIO 2011». От Российской Федерации представительная группа была делегирована Минпромторга России во главе с заместителем министра Д.В. Мантуровым. Присутствовали также губернатор Кировской области

Н.Ю. Белых, сотрудники ОАО «РОСНАНО», фонда «Сколково», ОАО «Российская венчурная компания», Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере и ряда российских компаний, занятых в сфере производства фармпрепаратов. Впервые на этом форуме был организован специализированный выставочный павильон Российской Федерации.

**Международная конференция  
по сельскому хозяйству, биосистемам,  
биотехнологии и биологическому инжинирингу  
(Амстердам, 13—15 июля 2011 г.)**

**13—15 июля 2011 года** в Амстердаме (Нидерланды) была организована Международная конференция по сельскому хозяйству, биосистемам, биотехнологии и биологическому инжинирингу («International Conference on Agricultural, Biosystems, Biotechnology and Biological Engineering» — ICABBBE 2011). Она собрала специалистов разного профиля, ученых, производителей, бизнесменов.

**Третье международное совещание по сохранению  
лесных генетических ресурсов Сибири  
(Красноярск, 23—29 августа 2011 г.)**

**23—29 августа 2011 года** в Красноярске состоялась Третье международное совещание по сохранению лесных генетических ресурсов Сибири. В работе совещания приняли участие специалисты из России, США, Норвегии, Венгрии, Эстонии и других государств. Был заслушан ряд важных докладов. Так, руководитель Агентства лесной отрасли Красноярского края М.В. Малькевич посвятил свое сообщение проблеме восстановления вырубленных лесов. В крае ведется большая работа в этом направлении с использованием как естественных, так и искусственных методов. За последнее пятилетие в крае наметилась тенденция к превышению площадей новых посадок леса над вырубленными массивами. И.о. директора Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН д.б.н. А.С. Шишкин подчеркнул значение научных разработок в деле сохранения лесных экосистем. Специалист из Венгрии Чаба Матиаш обсудил вопрос о развитии природоохранной генетики в условиях из-

меняющегося климата. В целом генетическим аспектам сохранения биоресурсов на совещании было уделено большое внимание.

**Международная конференция  
по сельскохозяйственной биотехнологии 2011  
(Йоханнесбург, 6–9 сентября 2011 г.)**

6–9 сентября 2011 года в Йоханнесбурге (ЮАР) состоялась Международная конференция по сельскохозяйственной биотехнологии («Agricultural Biotechnology International Conference 2011»). Главными темами были биоэкономика, геномные технологии, продукты биоиндустрии, биотопливо, биофармацевтика, экологическая и пищевая безопасность.

**Конференция  
«BIO India International Partnering Conference»  
(Хайдарабад, 21–22 сентября 2011 г.)**

21–22 сентября 2011 года в Хайдарабаде (Индия) прошла вторая ежегодная конференция «BIO India

International Partnering Conference». Ее организатор — Biotechnology Industry Organization (BIO), объединяющая более 1100 биотехнологических компаний. Одной из главных задач этого набирающего силу международного мероприятия является обеспечение возможностей для эффективного партнеринга всем заинтересованным специалистам, занимающимся бизнесом в области биотехнологии. Состоялись пленарные и секционные заседания, на которых были обсуждены главным образом проблемы стратегического развития биотехнологии в Индии и другие вопросы.

**I Европейский конгресс  
по прикладной биотехнологии  
(Берлин, 25–29 сентября 2011 г.)**

25–29 сентября 2011 года в Берлине состоялся Первый Европейский конгресс по прикладной биотехнологии. Основные направления — водоросли и фотобиотехнология, биоэкономика, биокатализ и биотрансформация, синтетическая биология, мембранные технологии, биофармацевтика, тканевая инженерия, возобновляемое сырье, биотопливо, биоэнергетика 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 30.09.11  
 Формат 60/90<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага офсетная № 1.  
 Печать офсетная. Гарнитура Академия.  
 Печ. л. 5,0. Тираж 1000 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*