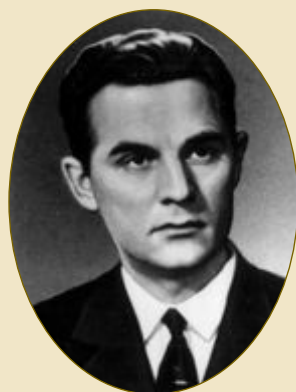


· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

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

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

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



Т. 6, № 2
2010

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРДТ ·

2010, Т. 6, № 2

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Васильов

Редакционная коллегия

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

Редакционный совет

В.А. Быков (Москва), В.А. Вахитов (Уфа), М.С. Вонский (Санкт-Петербург),
В.Г. Дебабов (Москва), С.Х. Дегтярев (Новосибирск), В.В. Зверев (Москва),
В.Т. Иванов (Москва), Л.В. Калакуцкий (Пуццино), М.П. Кирпичников (Москва),
О.И. Киселев (Санкт-Петербург), А.И. Мирошников (Москва),
Т.В. Овчинникова (Москва), О.Н. Озолинь (Пуццино), Е.Н. Орешкин (Москва),
А.Н. Панин (Москва), Е.В. Пименов (Киров), В.О. Попов (Москва),
К.Г. Скрыбин (Москва), Г. Хаммерлинг (Германия), Р.М. Хаитов (Москва),
В.И. Швец (Москва), Н.К. Янковский (Москва)

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

Зав. редакцией О.В. Воробьева

Адрес: 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, 2010.

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Васильев* 4

Оригинальные статьи

Разработка экспресс-метода определения токсичности зернопродуктов и комбикормов.
Т.А. Ковалева, М.Г. Холявка 5

Новые препараты целлюлаз для высокоэффективного осахаривания лигноцеллюлозных материалов.
*А.П. Синецын, А.В. Гусаков, А.А. Скомаровский, Е.Г. Кондратьева, Д.О. Осипов,
А.Г. Правильников, Р.М. Андрианов, О.Н. Окунев, А.О. Беккаревич, В.В. Матыс,
А.В. Кошелев, Т.В. Бубнова, А.Х. Берлин* 11

Краткие сообщения

Кинетика совместного окисления дигидрокверцетина и о-дианизидина перекисью водорода
в присутствии пероксидазы хрена.
В.В. Рогожин, Д.В. Перетолчин 16

Оценка влияния гидролизата казеина на биосинтез анабазина в условиях *in vitro*.
А.П. Андреева 20

Влияние хитозана и его производных на деградацию крахмала под действием амилаз.
Д.В. Тарабукин, М.А. Торлопов 23

Обзоры

Краткий обзор современного состояния и перспективных направлений развития производства
и применения лечебно-профилактических препаратов бактериофагов.
И.В. Красильников, А.К. Лобастова, К.А. Лыско 28

Некоторые аспекты методологии определения эффективности биологически активных соединений.
Н.Г. Плехова, Л.М. Сомова, К.А. Дрекло 34

Совершенствование микробиологических технологий на основе специализированных
систем автоматизации научных исследований.
С.Г. Мухачев, В.М. Емельянов, А.С. Сироткин, М.В. Шулаев 45

Политика Российской Федерации в области наук о жизни и инновационной биоэкономики.
А.В. Хлунов 54

От системной биологии к медицине P4 (Predictive, Personalized, Preventive, Participatory).
Лерой Худ 58

Мировая биотехнология: улучшение качества жизни, социальной среды и национальных экономик.
Стивен Беррилл 63

Страницы истории

Юбилейные и знаменательные даты 2010 года 69

Хроника

События первой половины 2010 года 72

Информация

Предстоящие мероприятия 2010 года 77

Правила для авторов 78

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov*4

Original articles

Development of an express method for mycotic toxins assay in grain-products and combine-forage.
T.A. Kovaleva, M.G. Holyavka5

New preparations of cellulases for highly efficient saccharification of lignocellulosic materials.
*A.P. Sinitsyn, A.V. Gusakov, A.A. Skomarovskiy, E.G. Kondrateva, D.O. Osipov,
A.G. Pravilnikov, R.M. Andrianov, O.N. Okunev, S.A. Bekkarevich, V.V. Matys,
A.V. Koshelev, T.V. Bubnova, A.K. Berlin*11

Short communications

Kinetics of combined oxidation of dihydroquercetin and o-dianisidine by hydrogen peroxide
in the presence of horseradish peroxidase.
V.V. Rogozhin, D.V. Peretolchin 16

Assessing the impact of casein hydrolyzate in the biosynthesis of anabasine in vitro.
A.P. Andreyeva20

Influence of chitosan and its derivatives on the degradation of starch under the action of amylases.
D.V. Tarabukin, M.A. Torlopov23

Reviews

A brief review of current status and future directions of development of production and use
of therapeutic and prophylactic drugs bacteriophages.
I.V. Krasilnikov, A.K. Lobastova, K.A. Lysko28

Some aspects of the methodology for determining the effectiveness of biologically active compounds.
N.G. Plehova, L.M. Somova, K.A. Drekkov34

Improved microbial technologies based on specialized automation systems research.
S.G. Mukhachev, V.M. Emelyanov, A.S. Sirotkin, M.V. Shulaev45

The policy of the Russian Federation in the field of life sciences and innovative bioeconomy.
A.V. Khlunov54

From systems biology to P4 medicine (Predictive, Personalized, Preventive, Participatory).
Leroy Hood58

Biotechnology worldwide: improving human life, social environment and national economics.
G. Steven Burrill63

Pages of history

Anniversary and significant dates 201069

The chronicle

Events of the first half-year 201072

The information

Forthcoming actions 201077

Rules for authors78

К читателям

Во втором номере журнала за 2010 год представлен ряд интересных работ, посвященных различным разделам биотехнологии. В исследовании из ФГУП «НПО Микроген» (Красильников И.В. и др.) рассматриваются значение бактериофагов в современной медицине и деятельность, осуществляемая в РФ с целью развития данного направления. В статье коллектива авторов под руководством профессора Синецына А.П. (МГУ им. М.В. Ломоносова, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН и др.) приведены результаты исследований целлюлаз, используемых для обработки лигноцеллюлозной биомассы.

Сотрудники Уральского отделения РАН Тарабукин Д.В., Торлопов М.А. (Сыктывкар) публикуют свои данные по хитозану, подчеркивая значение этого цикла исследований для решения проблемы производства биodeградируемых полимеров.

Группа авторов из Казани (Мухачев С.Г. и др.) сделала обзор по промышленным аспектам биотехнологии, опираясь на свой опыт решения практических вопросов в масштабах Республики Татарстан.

В статье Ковалевой Т.А., Холявка М.Г. (Воронежский государственный университет) сообщается о разработке экспресс-метода, позволяющего получать количественную информацию о содержании микотоксинов в зернопродуктах и комбикормах.

Исследователи из Якутской государственной сельскохозяйственной академии Рогожин В.В., Перетолчин Д.В. выявили биохимические особенности некоторых антиоксидантов (дигидрокверцетин, кверцетин и др.).

Плехова Н.Г. с соавт. (Владивосток) в своем обзоре проанализировали способы оценки эффективности биологически активных соединений, а Андреева А.П. из Карагандинского медицинского университета (Казахстан) изучила влияние органических добавок на биосинтез анабазина в культуре клеток *A. arylla* L.

В настоящем номере начинается печатание материалов II Международного конгресса «ЕвразияБио-2010», состоявшегося в Москве 12–15 апреля 2010 года и явившегося значительным событием для отечественных и зарубежных специалистов в этой области (итоговая справка о данном мероприятии приводится в разделе «Хроника»). Даны материалы трех докладов на первом пленарном заседании – А.В. Хлунова, Лероя Худа, Стивена Беррилла.

В конце номера помещена юбилейная статья к 70-летию академика РАН А.И. Мирошникова. Печатаются подборка к 100-летию первых публикаций Т.Х. Моргана, заложивших структурные основы хромосомной теории наследственности, некролог памяти Маршалла У. Ниренберга.

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

РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕСС-МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ЗЕРНОПРОДУКТОВ И КОМБИКОРМОВ

Т.А. КОВАЛЕВА*, М.Г. ХОЛЯВКА

Воронежский государственный университет

Разработан экспресс-метод, позволяющий получить количественную информацию о содержании микотоксинов в зернопродуктах и комбикормах. Предлагаемый способ определения токсичности дает возможность обнаружить присутствие токсинов в концентрации 10^{-3} – 10^{-4} мкг на пробу, что подтверждает его значительно большую чувствительность, чем у используемых в настоящее время методов.

Ключевые слова: глюкоамилаза, микотоксины.

Введение

В настоящее время в пищевой и фармацевтической промышленности приобретает особое значение разработка экспресс-методов определения содержания микотоксинов — токсических метаболитов плесневых грибов, которые широко распространены в природе и обладают мутагенными, тератогенными и канцерогенными свойствами. Они являются загрязнителями пищевых продуктов и зернового сырья, и поэтому необходим строгий контроль содержания микотоксинов в продовольственных товарах, а также в кормах сельскохозяйственных животных.

Выделяют четыре основных класса микотоксинов: афлатоксины, охратоксины, зеараленоны и трихотецены. Афлатоксины считаются наиболее опасными и широко распространенными микотоксинами. Они вырабатываются некоторыми штаммами *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus* и представляют собой четыре соединения группы бис-фуранкумариновых метаболитов, обозначаемых В1, В2, У1 и У2. К семейству афлатоксинов относятся также более 10 соединений, являющихся производными основных групп. Продуцентами охратоксинов (изокумаринов) являются *Aspergillus ochraceus*

и *Aspergillus viridatum*, а трихотеценов — грибы рода *Fusarium* [1].

В качестве природных загрязнителей пищевых продуктов и кормов обнаружено четыре представителя класса трихотеценов: Т-2 токсин, ниваленол, дезоксиниваленол, диацетотоксикирпенол. Микроскопические грибы рода *Fusarium* могут продуцировать и другие микотоксины, среди которых наибольшее значение имеет зеараленон, лактон резорциловой кислоты. Афлатоксины и охратоксины при остром отравлении вызывают очаги некрозов в миокарде, печени, почках, селезенке, желудочно-кишечном тракте; они снижают каталитическую активность таких ферментов, как щелочная и кислая фосфатаза, АТФаза, глюкозо-6-фосфатаза. Зеараленон отличается от других микотоксинов наличием выраженных гормоноподобных свойств и отсутствием летального действия.

Известен ряд биологических методов определения токсичности сырья и продуктов питания, но они имеют недостаточную чувствительность, являются дорогостоящими, занимают много времени. Так, длительность анализа, проводимого с использованием белых мышей, составляет 72 ч, кроликов — 168 ч, рыб гуппи — 24 ч. Кроме того, необходимы живые объекты и подходящие условия для их содержания [2, 3].

В настоящее время распространенным способом определения микотоксинов в различных объектах является метод на базе твердофазной экстракции и высокоэффективной жидкостной хроматографии [4]. Используется также прямой иммуоферментный анализ образцов продуктов питания и кормов [5], но все вышеперечисленные подходы требуют специальной аппаратуры.

© 2010 г. Ковалева Т.А., Холявка М.Г.

* **Автор для переписки:**

Ковалева Тамара Андреевна

доктор биологических наук, профессор кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета 394006 Воронеж, Университетская площадь, 1, каб. 68

Тел.: (4732) 208578; (4732) 208586

Факс: (4732) 208308

E-mail: Tamara_Kovaleva@inbox.ru

С целью разработки экспресс-метода определения токсичности пищевых и зерновых продуктов, не требующего дорогостоящей аппаратуры и наличия лабораторных животных, изучено влияние микотоксинов Ф-2, Т-2, охратоксина А на физико-химические свойства глюкоамилазы (α -1,4: 1,6-глюкан-4,6-глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3).

Материалы и методы

Материалом исследования служили чистые культуры грибов *Fusarium graminearum*-62 и *Aspergillus ochraceus*-132429, продуценты токсинов Ф-2, Т-2 и охратоксина, выращенные на автоклавированном зерне и комбикорме рецепта ПК-1. Для исследования использовали коммерческий препарат глюкоамилазы — Глюкоавомарин ГЗХ, полученный из *Aspergillus awamory* 466 (производитель — Ладыжинский завод ферментных препаратов), дополнительно очищенный методом гель-хроматографии на сефадексе G-200 фирмы «Pharmacia» (Швеция).

Влияние метаболитов токсинообразующих грибов на активность глюкоамилазы изучали глюкозооксидазным методом [6]. Метод определения глюкоамилазной активности основан на специфическом определении глюкозы, образующейся при действии глюкоамилазы на растворимый крахмал. Определение проводили с помощью набора стандартных реагентов «Оксохром ГЛЮКОЗА С» производства фирмы «Lachema» (Чехия).

Расчет активности глюкоамилазы осуществляли по формуле:

$$A = C / 180bt,$$

где А — каталитическая активность глюкоамилазы, ед/мг; С — количество глюкозы, мкг; t — время гидролиза, мин.; 180 — молекулярная масса глюкозы, Да; b — количество фермента в реакционной смеси, мг/мл гидролизата, которое мы определяли по методу Лоури.

Анализ полученных данных проводили путем сравнения каталитической активности глюкоамилазы в присутствии экстракта из чистого продукта и активности при инкубации фермента с экстрактом зараженного зерна или комбикорма. Определение токсичности основано на снижении активности фермента глюкоамилазы под действием продуктов, инфицированных микроскопическими грибами и содержащих микотоксины. О токсичности исследуемых образцов судили по изменению активности глюкоамилазы при добавлении в инкубируемый раствор 1 мл экстракта (к контрольному раствору добавляли 1 мл чистого ацетона).

Экстракцию микотоксинов из пищевых продуктов осуществляли по следующей методике. Пробу продукта измельчали в течение 2 мин. Навеску 25 г измельченного продукта помещали в плоскодонную коническую колбу на 250 мл, перемешивали с 25%-ным раствором хлористого натрия, добавляли 100 мл ацетона и встряхивали в течение 30 мин. Полученную смесь фильтровали через бумажный складчатый фильтр в мерный цилиндр, отбирали 50 мл фильтрата.

К 50 мл фильтрата добавляли 20 мл 15%-ного раствора уксуснокислого свинца и 30 мл дистиллированной воды, перемешивали и оставляли на 10 мин. в темноте. Отфильтровывали образовавшийся осадок, отбирали 80 мл фильтрата, переносили в делительную воронку, добавляли 40 мл гексана, смешивали и после разделения слоев отделяли нижний водно-ацетоновый слой. Верхний гексановый слой отбрасывали. К водно-ацетоновому раствору добавляли 40 мл хлороформа и встряхивали в делительной воронке. После разделения слоев нижний хлороформный слой отделяли, а к верхнему водно-ацетоновому слою добавляли 30 мл хлороформа и 15 мл ацетона. После встряхивания и разделения слоев нижний хлороформный слой отделяли. Объединенные хлороформные экстракты помещали в колбу на 100 мл с притертой пробкой, добавляли 5 г безводного сернокислого натрия, перемешивали и оставляли на 30 мин. в темноте. Раствор фильтровали и выпаривали при температуре 50 °С.

Инкубацию фермента с микотоксинами осуществляли в течение 10 мин. при 40 °С с последующим определением каталитической активности. Снижение активности тест-объекта глюкоамилазы достоверно устанавливается при концентрации фермента 10^{-5} моль/л и исследуемых токсинов 3×10^{-8} моль/л.

Подготовку образцов для анализа методом инфракрасной спектроскопии (ИКС) осуществляли по стандартной методике. Монокристаллический КВг растирали в вибраторе Ардена-Фирша (Германия), а затем высушивали в сушильном шкафу при 200 °С в течение 48 ч. Проверку на чистоту и отсутствие влаги проводили путем записи спектрограмм. Подготовленный бромид калия хранили в закрытом крышечкой бюксе, помещенном в эксикатор.

Исследуемые образцы фермента высушивали до постоянной массы при 37 °С для удаления свободной воды. Затем их измельчали в вибраторе Ардена-Фирша в течение 4 мин. до мелкодисперсного состояния («пудры»). После этого взвешивали 1,5 мг препарата энзима и 150 мг подготовленного бромистого калия и тщательно

перемешивали в вибраторе Ардена в течение 10 мин. Далее 100 мг смеси переносили в пресс-форму, равномерно распределяя по всему каналу и помещали под пресс (давление 150 кг/см²) на 30 мин. При высоком давлении в пресс-форме кристаллы КВг становятся пластичными, образуют прозрачную матрицу, в которой равномерно распределено исследуемое вещество.

Измерения делали с помощью многофункционального ИК-спектрофотометра SPECORD M-80 (Германия).

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили, используя пакет программ «Statgraphics». Достоверность отличий контрольных и экспериментальных результатов оценивали при помощи t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Показано (табл. 1), что микотоксины Ф-2 и Т-2, охратоксин А и афлатоксин В1 являются ингибиторами фермента глюкоамилазы.

В связи с тем, что зараженность пищевых продуктов и различного сырья обусловлена присутствием комплекса микотоксинов, было исследовано влияние смеси афлатоксинов В1, В2, G1, G2 (табл. 2) на каталитическую активность глюкоамилазы. При инкубировании глюкоамилазы со смесью афлатоксинов В1, В2, G1, G2 (концентрация $\approx 10^{-11}$ моль/л) каталитическая активность фермента практически не изменялась. Концентрация афлатоксинов в смеси порядка 10^{-10} моль/л оказывала ингибирующее действие, снижая активность фермента на 26%; воздействие афлатоксинов (10^{-9} моль/л) приводило к снижению активности на 52% и 10^{-8} моль/л — на 75% (рис. 1).

Таблица 1

Влияние чистых микотоксинов на каталитическую активность глюкоамилазы

Концентрация чистых микотоксинов, моль/л	Снижение каталитической активности глюкоамилазы, %			
	Микотоксин Т-2	Микотоксин Ф-2	Охратоксин А	Афлатоксин В1
10^{-8}	17,0	7,0	5,0	—
10^{-7}	41,0	11,0	7,0	—
10^{-4}	42,0	—	—	—
10^{-3}	41,5	29,0	37,0	32,0
10^{-2}	—	28,9	37,1	31,9

Таблица 2

Влияние концентрации смеси афлатоксинов В1, В2, G1, G2 на каталитическую активность глюкоамилазы

Концентрация афлатоксинов в смеси, моль/л	Активность глюкоамилазы, ед/мг
В1 $3,2 \times 10^{-8}$ В2 3×10^{-8} G1 $1,6 \times 10^{-8}$ G2 $1,5 \times 10^{-8}$	12,14 \pm 0,39
В1 $3,2 \times 10^{-9}$ В2 3×10^{-9} G1 $1,6 \times 10^{-9}$ G2 $1,5 \times 10^{-9}$	23,24 \pm 0,40
В1 $3,2 \times 10^{-10}$ В2 3×10^{-10} G1 $1,6 \times 10^{-10}$ G2 $1,5 \times 10^{-10}$	35,86 \pm 0,54
В1 $3,2 \times 10^{-11}$ В2 3×10^{-11} G1 $1,6 \times 10^{-11}$ G2 $1,5 \times 10^{-11}$	47,78 \pm 0,87

Анализ данных по влиянию отдельных микотоксинов и их смеси на активность глюкоамилазы позволяет сделать заключение о том, что смесь афлатоксинов приводит к более значительному снижению каталитической активности глюкоамилазы, чем отдельные микотоксины той же концентрации.

Для выяснения характера взаимодействия микотоксинов с молекулой фермента были сняты ИК-спектры нативной и инкубированной с микотоксинами Ф-2 и Т-2 (10^{-4} моль/л) глюкоамилазы. Спектр немодифицированного фермента (рис. 2) имеет четкие полосы поглощения в области 3300 см⁻¹ (амид I) и 1604 см⁻¹, 1500 см⁻¹ (амид II), полоса поглощения 1350–1390 см⁻¹ обусловлена наличием групп С-СН₃ и С-(СН₃)₂.

Информацию о состоянии вторичной структуры белковой молекулы могут давать полосы амид I и амид II, но наиболее эффективно использовать полосу амид I [7]. После инкубации фермента с токсином Ф-2 в ИК-спектре наблюдаются сдвиг пика поглощения из области 3300 в область 3250 см⁻¹, а также размытость полосы поглощения 1600–1604 см⁻¹, что может свидетельствовать об образовании межмолекулярных водородных связей между ОН-группами Ф-2 и карбонильными группировками аспарагиновой и глутаминовой аминокислот, расположенных на поверхности белковой глобулы [8, 9].

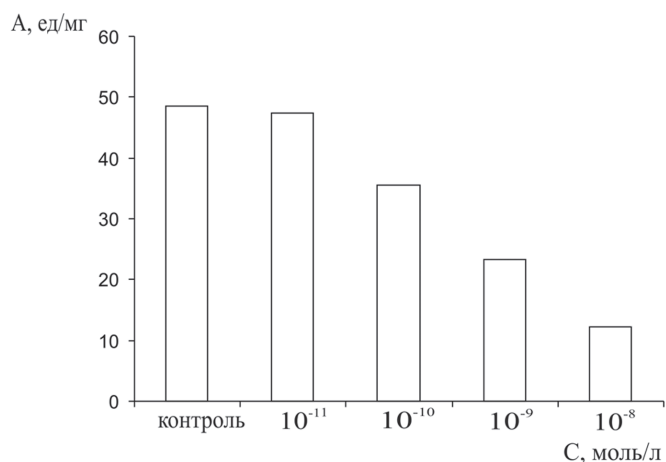


Рис. 1. Влияние концентрации афлатоксинов В1, В2, G1, G2 в смеси на каталитическую активность глюкоамилазы

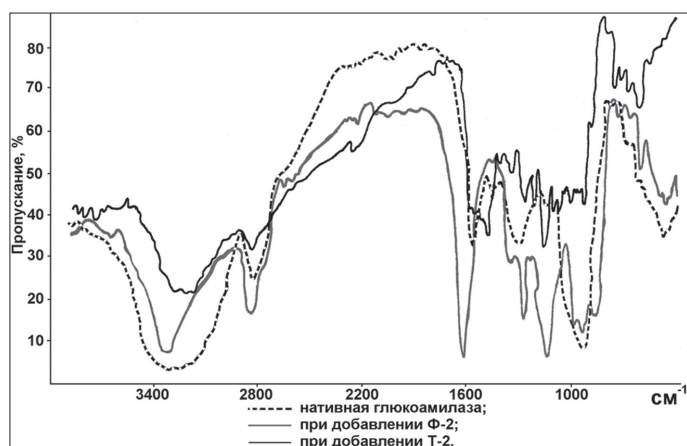


Рис. 2. ИК спектры нативной глюкоамилазы и при инкубации с микотоксинами Ф-2 и Т-2

Aleshin A. et al. (1993) путем рентгеноструктурного анализа показали, что поверхность молекулы глюкоамилазы гликозилирована: 10 аминокислотных остатков серина и треонина имеют маннозу (Ser-453, Ser-455, Ser-459, Thr-457 и др.).

Данный фермент характеризуется наличием N-терминального домена, состоящего из 440 аминокислотных остатков, O-гликозилированного участка, имеющего 70 аминокислот, и C-терминального крахмалсвязывающего домена (100 аминокислот).

Каталитический домен имеет 2 N-гликозилированных участка, причем контакт между N-гликозилированными цепями и полипептидом стабилизируется остатком маннозы с помощью водородной связи или ионизированными молекулами воды, чем и определяется стабильность фермента и возможность образования надмолекулярных

структур. O-гликозилированный домен имеет остатки Gly перед и после C-конца, которые представляют собой изгибы, определяющие взаимодействие крахмалсвязывающего домена с каталитическим и соответствующую ориентацию молекулы субстрата. Гликозилирование предотвращает скопление молекул субстрата в связывающих центрах и обеспечивает стехиометрическое связывание [10].

Можно предположить, что микотоксины, взаимодействуя с остатками глутамина, нарушают взаимодействие каталитического и связывающего доменов глюкоамилазы и, следовательно, снижают активность данного фермента.

Методом компьютерного моделирования установлено, что для молекул нативной глюкоамилазы характерна плотная упаковка гидрофобного ядра в виде 13 α -спиральных участков, а также антипараллельных β -структур, образующих 11 петель [11]. После инкубации глюкоамилазы с микотоксином Т-2 в ИК-спектре заметные изменения произошли в области поглощения CH_3 -групп ($2900\text{--}2920\text{ см}^{-1}$), интенсивность пика увеличена, что может свидетельствовать о появлении гидрофобных групп на поверхности молекулы за счет действия токсина.

Полоса амид II смещается из области 1606 см^{-1} в область 1671 см^{-1} , сохраняет свое положение пик при 1000 см^{-1} , отвечающий за монозамещенные ароматические группировки, но он несколько меняет свои очертания, что может указывать на новые заместители, появляющиеся в этих группах. Значительно увеличена интенсивность пика на 1353 см^{-1} , характеризующего наличие групп C- CH_3 .

Анализ ИК-спектра глюкоамилазы, модифицированной токсином Т-2, позволяет сделать заключение о том, что между молекулой фермента и микотоксином Т-2 возникают многочисленные гидрофобные взаимодействия, приводящие к значительному изменению конформации белка и выходу на поверхность R-радикалов гидрофобных аминокислотных остатков, чем и обусловлено снижение каталитической активности фермента.

В связи с тем, что получение продуктов, зараженных штаммами микроскопических грибов и содержащих микотоксины, занимает много времени, нами были предприняты попытки использовать в качестве модели продукты, зараженные растворами чистых микотоксинов. В результате было показано (табл. 3), что добавление экстракта из зараженных объектов вызывало снижение каталитической активности глюкоамилазы от 20 до 84%.

**Влияние экстрактов из доброкачественных и токсичных комбикормов
и зернопродуктов на активность глюкоамилазы**

Исследуемые продукты	Концентрация микотоксинов, мкг/кг	Снижение активности глюкоамилазы, %
Доброкачественное зерно и комбикорма (нетоксично)		
Пшеница Ячмень Кукуруза Отруби Комбикорм	Микотоксины не обнаружены	В пределах ошибки опыта
Зерно и комбикорма, зараженные микотоксинами (токсично)		
Пшеница	Т-2 ($3,0 \times 10^{-3}$)	42
	Ф-2 ($2,0 \times 10^{-2}$)	29
	Охратоксин А ($7,5 \times 10^{-3}$)	37
	Афлатоксин В1 ($8,42 \times 10^{-3}$)	32
Ячмень	Т-2 ($1,9 \times 10^{-3}$)	36
	Ф-2 ($2,0 \times 10^{-3}$)	32
	Охратоксин А ($3,0 \times 10^{-3}$)	50
	Афлатоксин В1 ($4,1 \times 10^{-3}$)	29
Кукуруза	Т-2 ($1,7 \times 10^{-3}$)	40
	Ф-2 ($1,6 \times 10^{-4}$)	46
	Охратоксин А ($3,1 \times 10^{-3}$)	44
	Афлатоксин В1 ($2,6 \times 10^{-3}$)	20
Отруби	Т-2 ($3,6 \times 10^{-3}$)	44
	Ф-2 ($4,1 \times 10^{-3}$)	34
	Охратоксин А ($3,4 \times 10^{-3}$)	56
	Афлатоксин В1 ($3,0 \times 10^{-3}$)	33
Комбикорм	Т-2 ($2,1 \times 10^{-3}$)	48
	Ф-2 ($1,2 \times 10^{-3}$)	40
	Охратоксин А ($6,0 \times 10^{-3}$)	84
	Афлатоксин В1 ($2,0 \times 10^{-3}$)	34

Заключение

Результаты наших экспериментов по исследованию влияния чистых препаратов микотоксинов В1, В2, G1, G2 и экстрактов из зараженного сырья на каталитическую активность глюкоамилазы дают возможность рекомендовать использование данной молекулярной модели для определения токсичности зерна и различных продуктов его переработки, пораженных микроскопическими грибами.

Предлагаемый нами способ позволяет обнаружить присутствие токсинов в концентрации 10^{-3} – 10^{-4} мкг на пробу и быстро получить количественную информацию о

содержании микотоксинов, что позволяет считать данный метод высокочувствительным и экспрессным.

Литература

1. Тутельян В.А., Кравченко Л.В. Микотоксины. – М.: Мир, 1985. – 320 с.
2. Курмаков И.А., Таланов Г.А. Определение токсичности комбикормов, пораженных микроскопическими грибами // Ветеринария. – 1977. – № 10. – С. 98–99.
3. Афанасьева Г.А., Щербухин В.Д. Исследование возможностей применения глюкозооксидазного метода определения глюкозы // Прикладная биохимия и микробиология. – 1975. – Т. 11. – № 9. – С. 460–462.

4. Meister U. New method of citrinin determination by HPLC after polyamide column clean-up // *European Food Research and Technology*. – 2004. – Vol. 218. – N 4. – P. 394–399.
5. Abouziedy M.M., Horvath A.D., Podlesny P.M., Regina N.P., Metodiev V.D., Kamenova-Tozeva R.M., Niagolova N.D., Steink A.D., Petropoulos E.A., Ganev V.S. Ochratoxin A concentrations in food and feed from a region with Balkan Endemic Nephropathy // *Food Additives Contaminants*. – 2002. – Vol. 19. – N. 8. – P. 755–764.
6. Ковалева Т.А. Физико-химические и кинетико-термодинамические аспекты катализа свободными и иммобилизованными амилазами: Дисс. ... д-ра биол. наук. – Воронеж: Воронежский государственный университет, 1998. – 421 с.
7. Чиргадзе Ю.Н. Инфракрасные спектры и структура полипептидов и белков. – М.: Наука, 1965. – 136 с.
8. Смит А. Прикладная ИК-спектроскопия. – М.: Мир, 1982. – 328 с.
9. Отто М. Современные методы аналитической химии: в 2 т. – М.: Техносфера, 2003. – Т. 1. – 416 с.
10. Aleshin A., Firsov L., Harris E., Honzatko R. Refined structure for the complex of 1-deoxynojiricin with glucoamylase from *Aspergillus awamori* Var. X100 to 2.4 angstrom resolution // *Biochemistry*. – 1993. – Vol. 32. – P. 1618–1626.
11. Артюхов В.Г., Ковалева Т.А., Кожокина О.М., Битюцкая Л.А., Дронов Р.В., Трофимова О.Д. Компьютерный анализ пространственной структуры некоторых гидролитических ферментов // *Биохимия*. – 2005. – Т. 70. – № 10. – С. 1318–1327.

DEVELOPMENT OF AN EXPRESS METHOD FOR MYCOTIC TOXINS ASSAY IN GRAIN-PRODUCTS AND COMBINE-FORAGE

T.A. KOVALEVA, M.G. HOLYAVKA

Voronezh State University

The express method, which allows to define a mycotic toxins content in grain-products and combine-forage, is developed. The suggested method of toxicity definition allows to find out the presence of toxins at concentration 10^{-3} – 10^{-4} mcg on the sample, that confirms its bigger sensitivity, than methods, used in last researches.

Keywords: glucoamylase, mycotic toxins.

НОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ ЦЕЛЛЮЛАЗ ДЛЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО ОСАХАРИВАНИЯ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МАТЕРИАЛОВ

А.П. СИНИЦЫН^{1, 2*}, А.В. ГУСАКОВ¹, А.А. СКОМАРОВСКИЙ¹, Е.Г. КОНДРАТЬЕВА²,
Д.О. ОСИПОВ², А.Г. ПРАВИЛЬНИКОВ², Р.М. АНДРИАНОВ², О.Н. ОКУНЕВ³,
А.О. БЕККАРЕВИЧ³, В.В. МАТЫС³, А.В. КОШЕЛЕВ³, Т.В. БУБНОВА³, А.Х. БЕРЛИН⁴

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, Москва, Россия;

²Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, Россия;

³Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пушино, Московская область, Россия;

⁴Лаборатория биотехнологии лесных продуктов, Университет Британской Колумбии, Ванкувер, Канада

Исследовано гидролитическое действие целлюлазных препаратов, продуцируемых новыми мутантными штаммами микроскопических грибов из родов *Penicillium* и *Trichoderma*, на различные виды древесного сырья. Установлено, что наибольшей реакционной способностью при ферментативном осахаривании обладает древесина пихты и тополя, предобработанная органозольвом. Обнаружено, что целлюлазы *P. verruculosum* значительно эффективнее гидролизуют предобработанную древесину, чем различные целлюлазные препараты *Trichoderma*. Продемонстрирован большой вклад слабо адсорбирующихся целлюлаз в эффективность ферментативного осахаривания целлюлозы. Показано, что высокая β -глюкозидазная активность важна для достижения высокой степени конверсии субстратов.

Ключевые слова: целлюлаза, осахаривание древесины, предобработка, *Penicillium*, *Trichoderma*.

Введение

Растительная лигноцеллюлозная биомасса представляет потенциальный интерес как дешевый и возобновляемый источник сырья для получения различных продуктов и топлива путем биоконверсии [1]. Перспективным сырьем является хвойная и лиственная древесина, а также отходы ее переработки [1–3]. Одной из главных проблем является то, что природная древесина и другие виды лигноцеллюлозной биомассы весьма устойчивы к ферментативному воздействию из-за кристаллической структуры целлюлозы, а также наличия в составе сырья лигнина, затрудняющего доступ ферментов к поверхности целлюлозных волокон [1, 2]. Поэтому для эффективного

гидролиза с помощью ферментов-целлюлаз требуется предварительная обработка сырья, направленная на разрушение кристаллической структуры целлюлозы и полное или частичное удаление лигнина. В настоящее время одними из наиболее дешевых и эффективных являются такие методы предобработки, как паровой взрыв и обработка водно-этанольной смесью в кислой среде (органозольвом) [4–6]. Последний способ приводит к более полному удалению лигнина из древесины и к образованию более реакционноспособного субстрата для ферментативного осахаривания.

Глубокая деструкция природных форм целлюлозы с образованием растворимых сахаров осуществляется под действием полиферментной системы целлюлаз, включающей в себя эндоглюканазы, целлобиогидролазы и β -глюкозидазы [1]. Эндоглюканазы и целлобиогидролазы образуют из нерастворимой целлюлозы растворимые олигосахариды и целлобиозу, которые далее под действием β -глюкозидазы превращаются в глюкозу. Взаимодействие компонентов целлюлазного комплекса определяет его эффективность при гидролизе целлюлозосодержащих субстратов.

Целью данной работы являлась оценка гидролитической способности ряда целлюлазных препаратов, продуцируемых новыми мутантными штаммами грибов из

© 2010 г. Сеницын А.П., Гусаков А.В., Скомаровский А.А., Кондратьева Е.Г., Осипов Д.О., Правильников А.Г., Андрианов Р.М., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Матыс В.В., Кошелев А.В., Бубнова Т.В., Берлин А.Х.

* Автор для переписки:

Сеницын Аркадий Пантелеймонович, д.х.н., профессор, заведующий лабораторией физико-химии ферментативной трансформации полимеров МГУ имени М.В. Ломоносова 119991 Москва, Ленинские горы, 1/11
Тел.: (495) 939-5966; Факс: (495) 939-0997;
E-mail: apsinityn@gmail.com

родов *Penicillium* и *Trichoderma*, сравнение реакционной способности различных видов древесины и эффективности разных способов ее предобработки, исследование вклада слабо и прочно адсорбирующихся целлюлаз в эффективность ферментативного осахаривания целлюлозосодержащих субстратов, а также изучение роли β -глюкозидазы в процессе гидролиза.

Материалы и методы

В работе использовали ферментные препараты целлюлаз, продуцируемые мутантными штаммами грибов *Penicillium verruculosum* В221-151 (ИБФМ РАН, г. Пущино), а также *Trichoderma spp.*: коммерческие препараты Целловиридин Г20х (ПО «Сибфарм», Бердский завод биологических препаратов), Celluclast 1.5 L (Novozymes, Дания), Fibrilase HDL 160 (Iogen, Канада), а также лабораторные препараты TW-307 (#1 и #2) и TW-1 (ИБФМ РАН, г. Пущино). В качестве дополнительного источника целлюлазы (β -глюкозидазы) использовали ферментный препарат Novozym 188, продуцируемый грибом *Aspergillus sp.* (Novozymes, Дания).

В качестве объектов для ферментативного осахаривания использовали образцы предобработанной паровым взрывом или органозольвом древесины разных пород дерева: 1) пихта (лжетсуга тиссолистная), обработанная органозольвом; 2) пихта, обработанная паровым взрывом; 3) пихта + 10% коры, обработанные паровым взрывом; 4) сосна, обработанная органозольвом; 5) тополь, обработанный органозольвом; 6) клен, обработанный органозольвом.

Предобработка древесины проводилась в Лаборатории биотехнологии лесных продуктов Университета Британской Колумбии (Ванкувер, Канада) [4, 5]. В качестве субстрата также использовали микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ – Авицел РН105 фирмы Serva, ФРГ).

Активность целлюлаз по фильтровальной бумаге (АФБ) измеряли по стандартной методике, используя хроматографическую бумагу Ватман № 1 (Whatman, Англия) в качестве субстрата [7]. β -Глюкозидазную активность измеряли, используя *p*-нитрофенил-глюкопиранозид (Sigma, США) в качестве субстрата и спектрофотометрически регистрируя накопление *p*-нитрофенола в реакционной смеси [8]. Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазно-пероксидазным методом [8]. Концентрацию восстанавливающих сахаров (ВС) определяли методом Шомоди – Нельсона [8, 9]. Концентрацию белка определяли методом Лоури [10].

Эксперименты по ферментативному осахариванию целлюлозы проводили в термостатируемых при 50 °С ячейках (объем 50 мл), помещенных на качалку. В ячейку вносили навеску предобработанной древесины или МКЦ, а также рассчитанные количества 0,1 М ацетатного буфера (рН 5,0) и раствора ферментного препарата. Реакционную смесь перемешивали на качалке (250 об./мин.). Концентрация субстрата в реакционной смеси составляла 50 г/л (в пересчете на сухое вещество), а разбавление ферментного препарата подбирали таким образом, чтобы получить необходимый уровень активности ферментов или концентрации белка в реакционной смеси. В большинстве экспериментов АФБ была 10 ед. на 1 г сухого субстрата, время гидролиза – 12 ч. Через необходимые промежутки времени из реакционной смеси отбирали пробы (1 мл), центрифугировали (1 мин.) и измеряли в супернатанте концентрацию ВС и глюкозы.

Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлены результаты оценки гидролитической способности ферментных препаратов при использовании различных образцов предобработанной древесины. Как видно из рисунка, наиболее подвержена ферментативному гидролизу древесина пихты и тополя (субстраты № 1 и 5), обработанная органозольвом. Меньшую реакционную способность проявила древесина, обработанная паровым взрывом (субстраты № 2 и 3). Заметно более высокие выходы ВС и глюкозы обеспечил при действии на все субстраты целлюлазный препарат В221-151 (*P. verruculosum*), причем этот препарат приводил к образованию в основном глюкозы (сравните между собой концентрацию ВС, рис. 1а, и концентрацию глюкозы – рис. 1б). Разница в гидролитической способности между препаратом *P. verruculosum* и препаратами *Trichoderma* наиболее заметна на пихтовой древесине, обработанной паровым взрывом. Различные препараты *Trichoderma* обладали сходной осахаривающей способностью, однако при действии на некоторые субстраты Fibrilase HDL160 и препараты серии TW-307 были несколько более эффективными; при этом препарат Fibrilase HDL160 давал более высокий выход глюкозы, чем остальные препараты на основе *Trichoderma*.

По современным представлениям о механизме ферментативного гидролиза целлюлозы, слабо адсорбирующимся целлюлазам отводится роль разрушения аморфных участков субстрата. После их воздействия становится доступным большее число целлюлозных волокон, а также образуются дополнительные концевые

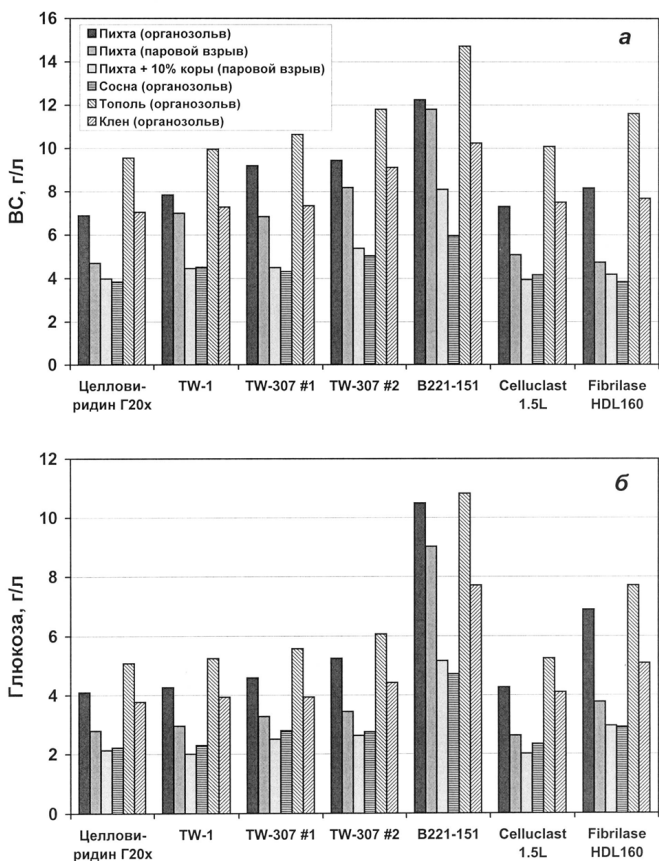


Рис. 1. Выход сахаров после 12 ч гидролиза различных образцов предварительно обработанной древесины. Условия: 50 °С, рН 5, перемешивание 250 об/мин. Концентрация субстрата – 50 г/л (сухой вес), целлюлазная активность в реакционной смеси – 10 ед. АФБ на 1 г сухого субстрата

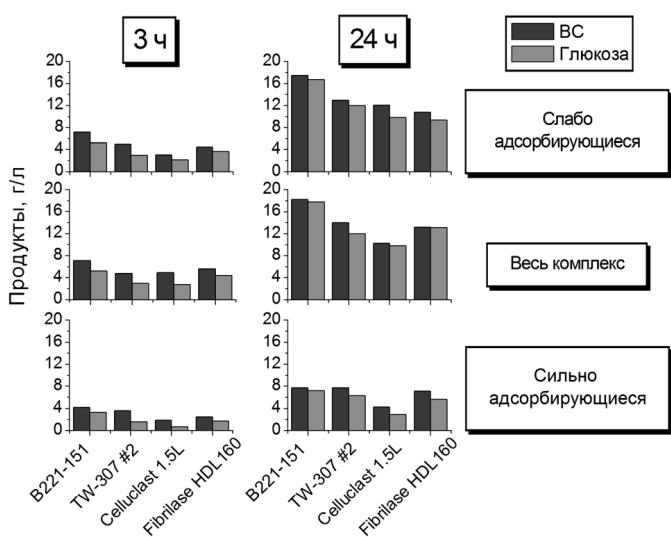


Рис. 2. Гидролиз МКЦ (50 г/л) слабо и сильно адсорбирующимися ферментами целлюлазных комплексов, рН 5, 50 °С; 250 об./мин.

группы для атаки целлобиогидролазами. Для оценки роли слабо адсорбирующихся целлюлаз мы проводили адсорбцию целлюлаз различных ферментных препаратов на МКЦ (50 г/л), после чего отделяли супернатант (содержащий слабо адсорбирующиеся ферменты) от осадка (содержащего прочно адсорбирующиеся ферменты). К супернатанту добавляли свежую порцию МКЦ (до 50 г/л), а к осадку – буферный раствор в количестве, эквивалентном отделенному супернатанту, и исследовали кинетику накопления ВС и глюкозы под действием слабо и прочно адсорбирующихся ферментов. Результаты отражены на рисунке 2.

Данные свидетельствуют, что вклад слабо адсорбирующихся ферментов целлюлазных комплексов в гидролиз МКЦ весьма значителен и существенно превосходит вклад сильно адсорбирующихся ферментов. Одним из объяснений такого эффекта может служить низкая адсорбционная способность β -глюкозидазы и ее значительный вклад в эффективность осахаривания целлюлозного субстрата. Это наглядно показано на рисунке 3, где отражены результаты гидролиза пихты, предварительно обработанной органозолью (образец № 1), смесью

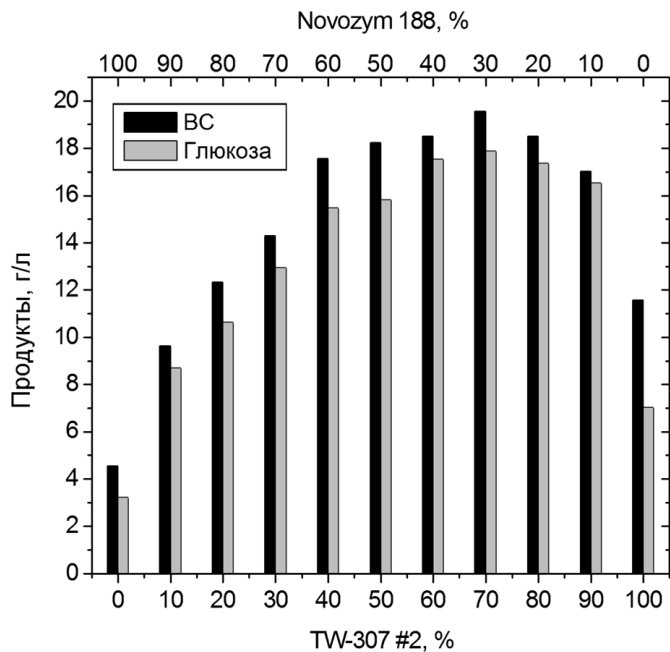


Рис. 3. Результаты гидролиза древесины пихты, предварительно обработанной органозолью (образец № 1, 50 г/л, сухой вес), смесями целлюлазного препарата TW-307 #2 (*Trichoderma*) и β -глюкозидазного препарата Novozym 188 различного состава, 50 °С, рН 5, перемешивание 250 об/мин. Во всех случаях содержание белка ферментных препаратов в реакционной смеси составляло 25 мг белка на 1 г сухого субстрата

целлюлазного препарата TW-307 #2 (*Trichoderma*) и β -глюкозидазного препарата Novozym 188. В этом эксперименте соотношение препаратов составляло соответственно 0:10, 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1 и 10:0. Наиболее эффективно гидролизовала целлюлозный субстрат смесь, содержащая 70% TW-307 и 30% Novozym 188, причем эта смесь в 2–3 раза эффективнее воздействовала на субстрат, чем эти же препараты, взятые в тех же количествах, но использованные отдельно.

Из полученных результатов можно сделать вывод, что β -глюкозидаза оказывает очень существенное влияние на эффективность осахаривания целлюлозы. Это подтверждают и данные экспериментов (рис. 4), в которых ферментативное осахаривание различных образцов древесины проводили теми же ферментными препаратами и в тех же условиях, что и на рисунке 1, но только во всех случаях в реакционную смесь дополнительно добавляли ферментный препарат Novozym 188 с высоким уровнем β -глюкозидазной активности (в количестве 20 ед. β -глюкозидазы на 1 г субстрата). После добавления препарата Novozym 188 во всех случаях практически единственным продуктом гидролиза (>90%) была глюкоза, при этом также заметно вырос общий выход сахаров (в том числе и для препарата *P. verruculosum* B221-151).

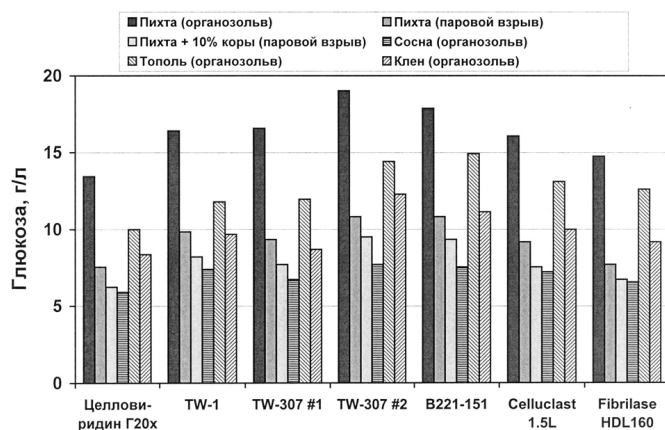


Рис. 4. Выход глюкозы после 12 ч гидролиза различных образцов предобработанной древесины. Условия такие же, как на рисунке 1, только во всех случаях в реакционную смесь дополнительно добавлена β -глюкозидаза (Novozym 188) в количестве 20 ед. на 1 г сухого субстрата

Разница между препаратом *P. verruculosum* и наиболее эффективными препаратами *Trichoderma* стала менее значительной, и в двух случаях (образцы пихты и клена, обработанные органозольвом) один из препаратов *Trichoderma* (TW-307 #2) оказался даже несколько

более эффективным, чем препарат *P. verruculosum* B221-151. Более заметный вклад β -глюкозидазы в эффективность гидролиза древесины целлюлазными препаратами *Trichoderma* объясняется тем, что их собственная β -глюкозидазная активность невысока (0,15–0,65 ед./мг белка). Препарат *P. verruculosum* B221-151, напротив, имел достаточно высокую β -глюкозидазную активность (1,5 ед./мг белка), поэтому вклад дополнительно добавленной β -глюкозидазы оказался не столь велик, как в случае препаратов *Trichoderma*.

Заключение

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Целлюлазный препарат *P. verruculosum* B221-151 значительно эффективнее гидролизует различные виды предобработанной древесины, чем препараты на основе ферментов *Trichoderma*.
2. Эффективность ферментативного гидролиза целлюлозы определяется сбалансированностью компонентного состава ферментных препаратов, а также наличием достаточного количества β -глюкозидазы в реакционной смеси.
3. Из исследованных различных типов древесины наиболее подвержены ферментативной деградации древесина пихты и тополя.
4. Предобработка древесины органозольвом и паровым взрывом существенно увеличивает реакционную способность древесины, причем предобработка органозольвом является более эффективной.

Литература

1. Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Био-конверсия лигноцеллюлозных материалов. — М.: Изд-во МГУ, 1995. — 222 с.
2. Galbe M., Zacchi G. A review of the production of ethanol from softwood // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2002. — Vol. 59. — P. 618–628.
3. Duff S.J.B., Murray W.D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review // Biores. Technol. — 1996. — Vol. 55. — P. 1–33.
4. Bura R., Mansfield S.D., Saddler J.N., Bothast R.J. SO₂-catalysed steam explosion of corn fibre for ethanol production // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2002. — Vol. 98–100. — P. 59–72.
5. Kurabi A., Berlin A., Gilkes N., Kilburn D. et al. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded and ethanol organosolv-pretreated Douglas-fir by novel and commercial fungal

- cellulases // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 121–124. – P. 219–230.
6. Zhao X., Cheng K., Liu D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 82. – P. 815–827.
7. Ghose T.K. Measurement of cellulase activities // *Pure. Appl. Chem.* – 1987. – Vol. 59. – P. 257–268.
8. Синецын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Методы исследования и свойства целлюлолитических ферментов. – М.: ВИНТИ, Сер. Биотехнология, Т. 25, 1990. – С. 80–83.
9. Somogyi M. Notes on sugar determination // *J. Biol. Chem.* – 1952. – Vol. 195. – P. 19–23.
10. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.

Список сокращений

АФБ – активность по фильтровальной бумаге,

ВС – восстанавливающие сахара,

МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза.

NEW PREPARATIONS OF CELLULASES FOR HIGHLY EFFICIENT SACCHARIFICATION OF LIGNOCELLULOSIC MATERIALS

A.P. SINITSYN^{1,2}, A.V. GUSAKOV¹, A.A. SKOMAROVSKIY¹, E.G. KONDRATEVA²,
D.O. OSIPOV², A.G. PRAVILNIKOV², R.M. ANDRIANOV², O.N. OKUNEV³,
S.A. BEKKAREVICH³, V.V. MATYS³, A.V. KOSHELEV³, T.V. BUBNOVA³, A.K. BERLIN⁴

¹ *M.V. Lomonosov Moscow State University Department of Chemistry, Moscow, Russia;*

² *A.N. Bach Institute of Biochemistry RAS, Moscow, Russia;*

³ *Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino, Moscow Region, Russia;*

⁴ *Laboratory of Forest Products Biotechnology, University of British Columbia, Vancouver, Canada*

The hydrolytic performance of cellulase preparations produced by new mutant strains of filamentous fungi *Penicillium* and *Trichoderma* spp. on different pretreated softwoods was investigated. Douglas fir and poplar softwoods pretreated by organosolv demonstrated the highest susceptibility to the enzymatic attack. Cellulases of *P. verruculosum* were more effective in hydrolysis of pretreated softwoods in comparison to different enzyme preparations based on *Trichoderma* spp. A major role of weakly adsorbed cellulases in enzymatic hydrolysis of cellulose was found. High β -glucosidase activity was found to be one of the major factors for achieving the high conversion degrees of lignocellulosic substrates.

Keywords: cellulase, softwood saccharification, pretreatment, *Penicillium*, *Trichoderma*.

КИНЕТИКА СОВМЕСТНОГО ОКИСЛЕНИЯ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА И О-ДИАНИЗИДИНА ПЕРЕКИСЬЮ ВОДОРОДА В ПРИСУТСТВИИ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА

В.В. РОГОЖИН*, Д.В. ПЕРЕТОЛЧИН

Якутская государственная сельскохозяйственная академия

Изучена стационарная кинетика совместного окисления о-дианизидина и дигидрокверцетина или кверцетина перекисью водорода, катализируемого пероксидазой хрена. Показано, что при совместном присутствии в реакционной среде дигидрокверцетин и о-дианизидин окисляются дифференцированно. Окисление о-дианизидина не наблюдалось до полного превращения дигидрокверцетина при рН 4,5–8,0. Изучены механизмы ингибирования пероксидазы дигидрокверцетином в реакциях окисления о-дианизидина. Кроме того, исследования пероксидазного окисления кверцетина позволили установить, что он является медленно окисляемым субстратом пероксидазы. При совместном окислении о-дианизидина и кверцетина при рН 4,5–7,0 наблюдался конкурентный тип ингибирования кверцетином пероксидазного окисления о-дианизидина, а при рН $\geq 7,5$ проявлялся неконкурентный тип ингибирования.

Ключевые слова: пероксидаза хрена, дигидрокверцетин, кверцетин, о-дианизидин, антиоксиданты, ферментативная кинетика.

Компонентами антиоксидантных систем живых организмов являются низко- и высокомолекулярные антиоксиданты, представителями которых могут быть аскорбиновая кислота, дигидрокверцетин, кверцетин, фенольные соединения и др., а также супероксиддисмутаза (СОД), каталаза и пероксидаза [2]. Последний фермент катализирует реакции оксидазного и пероксидазного окисления неорганических и органических соединений, среди которых имеются соединения, обладающие антиоксидантным действием. Изучению взаимодействия пероксидазы и различных антиоксидантов посвящено много работ [6–9]. Однако несмотря на это механизм действия фермента недостаточно изучен.

Субстраты пероксидазы условно разделяют на медленно и быстро окисляемые. Различия между субстратами этих двух групп обычно определяются величинами каталитических констант. При их совместном окислении обычно быстро окисляемый субстрат ускоряет окисление медленно окисляемого. Этот механизм получил название субстрат-субстратной активации [3]. Функцио-

нальное значение механизм приобретает в биологических системах, где различные по природе субстраты пероксидазы могут находиться в одной из клеточных структур или в цитоплазме клетки.

Реакции пероксидазного окисления о-дианизидина (ОДН) в присутствии пероксидазы хорошо изучены [4, 5]. Установлено, что промежуточные радикалы о-дианизидина, образованные в реакции с Е1, способны восстанавливать образовавшийся Е2 до нативного фермента. При проведении этой реакции в среде не обнаружены свободные радикалы, поэтому реакция протекает посредством образования комплекса Е2 с радикалом полуокисленного субстрата. При этом образовавшийся радикал может не выходить в раствор, а оставаться на ферменте, образуя фермент-субстратный комплекс с полуокисленной формой ОДН. При наличии в среде медленно окисляемых субстратов этот комплекс способен ускорить процесс их окисления. Однако этот механизм недостаточно изучен.

Поэтому целью данной работы было изучить кинетику индивидуального и совместного с ОДН окисления дигидрокверцетина (ДГКВ) и кверцетина (КВ) в широком диапазоне рН.

В работе использовали пероксидазу хрена производства «Reanal» (Венгрия) со спектральным показателем чистоты $RZ=1,0$. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически [12] и по пиридингеохромогену [10]. Использовали дигидрокверцетин и кверцетин

© 2010 г. Рогожин В.В., Перетолчин Д.В.

* Автор для переписки:

Рогожин Василий Васильевич

д.б.н., профессор, зав. лабораторией исследования БАВ,
Якутская государственная сельскохозяйственная академия
Республика Саха, 677002 Якутск, ул. Красильникова, 15
Тел.: 8-(4112)35-78-13*124; Факс: 8-(4112)-35-78-13

E-mail: vrogozhin@mail.ru

от концерн «Биопрепарат» (Россия). *o*-Дианизидин марки «ч» очищали возгонкой в вакууме. Концентрацию перекиси водорода («Рехим», Россия) определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения при 230 нм $72,7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [11].

Реакцию окисления *o*-дианизидина (17–172 мМ) и дигидрокверцетина (0,25–0,76 мкМ) или кверцетина (0,5–1,0 мкМ) перекисью водорода (0,64 мМ) проводили при 25 °С в 0,1 М натрий-ацетатного, рН 4,5–6,0, или натрий-фосфатного, рН 6,0–8,0, буферов, при концентрации пероксидазы хрена 0,1–0,4 нМ. Реакцию совместного окисления *o*-дианизидина и дигидрокверцетина или кверцетина изучали по возрастанию поглощения при 460 нм ($\epsilon = 30 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) [4]. Кинетические кривые снимали на двухлучевом спектрофотометре DMS 100 S фирмы «Varian» (США). За единицу активности фермента принимали его количество, окисляющее 1 мкмоль субстрата за 1 мин. Кажущиеся константы скорости окисления субстратов пероксидазы определяли из данных по стационарной кинетике [1].

Влияние дигидрокверцетина и кверцетина на пероксидазное окисление *o*-дианизидина, катализируемое пероксидазой хрена, было изучено в диапазоне рН 4,5–8,0.

На рисунке 1 представлены кинетические кривые пероксидазного окисления ОДН в отсутствие (рис. 1, кривая 1) и в присутствии (рис. 2, кривая 2) дигидрокверцетина. На кривой 2 рисунка 1 отмечается наличие двух участков, свидетельствующих о том, что при совместном присутствии в реакционной среде ОДН и ДГКВ окисляются в присутствии перекиси и пероксидазы дифференцированно. Наличие первого участка обусловлено окислением ДГКВ, тогда как второй участок соответствует окислению кверцетина. Появление индукционного периода на кинетической кривой в реакции совместного окисления ОДН и ДГКВ обусловлено преимущественным окислением дигидрокверцетина, продуктом окисления которого служит кверцетин. Последний способен также влиять на окисление ОДН, что вызывает появление второго участка на кинетической кривой.

Величина периода индукции зависит от рН среды (см. рис. 2) и от концентрации ОДН. При рН < 6,0 окисление ДГКВ в присутствии ОДН происходит очень быстро. При этом окисление ОДН не наблюдается до 100% превращения ДГКВ, а период индукции становится минимальным.

Изучено влияние ДГКВ на пероксидазное окисление ОДН, катализируемое пероксидазой хрена. Показано, что дигидрокверцетин может ингибировать фермент при рН 6,0–7,0 по конкурентному типу.

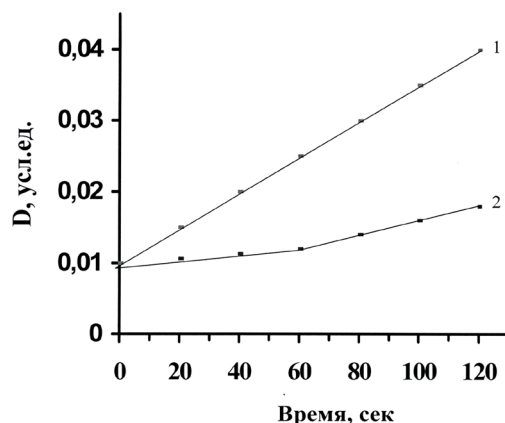


Рис. 1. Кинетические кривые окисления *o*-дианизидина в отсутствие (1) и в присутствии (2) дигидрокверцетина. Концентрации: пероксидаза – 0,1 нМ; H_2O_2 – 0,64 мМ; *o*-дианизидин – 13,8 мкМ; дигидрокверцетин – 0,8 мкМ; 0,1 М натрий-фосфатный буфер, рН 6,5

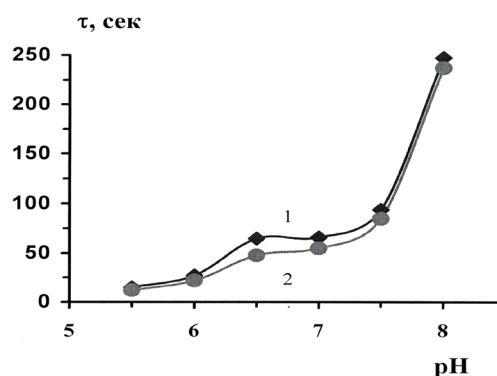


Рис. 2. Зависимости τ от рН среды при различных концентрациях *o*-дианизидина: 13,8 (1), 20,6 мкМ (2); концентрации: пероксидаза – 0,1 нМ, H_2O_2 – 0,64 мМ; дигидрокверцетин – 0,8 мкМ

Кинетические данные представленные в двойных обратных координатах Лайнуивера – Берка, при рН 6,0–7,0 имели вид семейства прямых с точкой пересечения на оси ординат. Откладывая экспериментальные данные в координатах ($K_m(\text{каж}), [\text{ДГКВ}]$), нами были определены константы конкурентного ингибирования.

При рН $\geq 7,5$ кинетические кривые пересекались в общей точке на оси абсцисс, что указывает на неконкурентный характер ингибирования. Константу неконкурентного ингибирования определяли, откладывая экспериментальные данные в координатах ($1/K_{\text{кат}}, [\text{ДГКВ}]$).

Продуктом окисления дигидрокверцетина является кверцетин. Поэтому нами изучено влияние кверцетина на пероксидазное окисление ОДН. При рН 4,5–7,0 наблюдается конкурентный тип ингибирования, при котором кинетические кривые пересекаются на оси ординат. Спрямляя экспериментальные данные в координатах ($K_m(\text{каж}), [КВ]$), удалось рассчитать константу ингибирования.

При $\text{pH} \geq 7,5$ характер зависимостей менялся и соответствовал неконкурентному типу ингибирования, при котором кинетические кривые пересекаются на оси абсцисс. Откладывая экспериментальные данные в координатах ($1/K_{\text{кат}}, [КВ]$), были определены константы неконкурентного ингибирования.

Были также определены рН-зависимости констант ингибирования дигидрокверцетина и кверцетина пероксидазы в реакциях окисления о-дианизидина.

Значения кинетических констант для реакций индивидуального и совместного пероксидазного окисления о-дианизидина, дигидрокверцетина и кверцетина при различных рН приведены в таблице 1.

На основании данных этой таблицы можно сказать, что дигидрокверцетин и кверцетин являются медленно окисляемыми субстратами пероксидазы. Величины каталитических констант для этих субстратов отличаются от ОДН в 102–103 раза. Причем, если дигидрокверцетин лучше окисляется в щелочной области рН, то кверцетин — при кислых рН. Константа связывания дигидрокверцетина в 5–18 раз лучше, чем у ОДН, тогда как у кверцетина константа связывания различается только 1,3–1,8 раз. При этом максимумы каталитической активности ОДН и кверцетина приходятся на рН 5,0–6,5.

При совместном окислении дигидрокверцетина и о-дианизидина окисляется только ДГКВ, скорость окисления которого зависит от рН. При $\text{pH} < 5,5$ наблюдается резкое ускорение окисления ДГКВ, которое практически не зависит от концентрации ОДН. Хотя в кислых рН в реакциях индивидуального окисления ДГКВ проявил себя как медленно окисляемый субстрат пероксидазы. Поэтому ускорение окислительного процесса обусловлено, прежде всего, присутствием в среде быстро окисляемого субстрата пероксидазы — о-дианизидина. Механизм активационного процесса основан на том, что полуокисленная форма ОДН образует комплекс с ферментом, который способен ускорять окисление ДГКВ. Аналогичный механизм был выявлен при изучении реакций окисления ферроцианида калия и ОДН, катализируемого пероксидазой хрена [8]. Протекание процесса обусловлено низкими значениями констант связывания, обеспечивающих преимущество флавоноидов. Избирательность связывания в активном центре фермента дигидрокверцетина способствует протеканию преимущественного окисления ДГКВ в кислых рН, а также обеспечивает преимущества в конкуренции за центр связывания при $\text{pH} \geq 6,0$. Однако при $\text{pH} \geq 7,5$ о-дианизидин и флавоноиды связываются в разных участках активного центра фермента, что лежит в основе проявления неконкурентного типа ингибирования.

При этих же диапазонах рН резко изменяется связывание и превращение ОДН, что было установлено в реакциях индивидуального окисления субстрата. Поэтому на основании полученных нами данных можно сказать, что понижение каталитического процесса пероксидазного окисления ОДН обусловлено тем, что субстрат при $\text{pH} \geq 6,0$ меняет место связывания в актив-

Таблица 1

Величины каталитических констант для индивидуального и совместного пероксидазного окисления о-дианизидина, дигидрокверцетина и кверцетина

рН	ОДН		ДГКВ		ОДН+ДГКВ		КВ		ОДН+КВ	
	ккат, сек ⁻¹	K_m , мкМ	ккат, сек ⁻¹	K_m , мМ	K_i , мкМ	Тип ингибирования	ккат, сек ⁻¹	K_m , мкМ	K_i , мкМ	Тип ингибирования
4,5	2200	35	1,4	1,40	—	—	208	12,0	0,25	конкурентный
5,0	2500	40	1,3	0,89	—	—	278	15,0	0,12	конкурентный
5,5	3000	35	4,6	2,72	—	—	252	14,6	0,09	конкурентный
6,0	2200	30	18,0	2,08	0,26	конкурентный	208	21,0	0,13	конкурентный
6,5	900	22	54,5	0,52	0,22	конкурентный	238	23,0	0,29	конкурентный
7,0	600	18	134,2	0,57	0,25	конкурентный	139	13,0	0,25	конкурентный
7,5	150	15	277,8	0,88	0,26	неконкурентный	48	24,0	4,30	неконкурентный
8,0	95	5	154,3	0,61	0,17	неконкурентный	19	3,7	1,30	неконкурентный

ном центре пероксидазы, что и обеспечивает понижение скорости реакции окисления. Медленно окисляемый субстрат (ДГКВ) пероксидазы в кислых рН в реакциях индивидуального окисления в присутствии быстро окисляемого субстрата становится быстро окисляемым.

Механизм окисления кверцетина несколько отличается от окислительного процесса дигидрокверцетина тем, что в кислых рН не наблюдается окисление флавоноида комплексом с полуокисленным ОДН. При рН 4,5–7,0 кверцетин конкурировал с ОДН за центр связывания, что проявлялось в конкурентном типе ингибирования. Однако при $\text{pH} \geq 7,5$ их места связывания различаются, что демонстрировалось неконкурентным типом ингибирования. Связывание в активном центре кверцетина препятствовало окислению ОДН по причине преимущественного окисления флавоноида.

Таким образом, на основании данных исследований реакций совместного окисления ОДН и флавоноидов можно заключить, что в действии пероксидазы заложен сложный регуляторный механизм, имеющий биологическое значение.

Литература

1. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. — М.: Изд-во МГУ, 1976. — 320 с.
2. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах // Успехи соврем. биол. — 1993. — Т. 113. — № 3. — С. 286–296.
3. Лебедева О.В., Угарова Н.Н. Механизм пероксидазного окисления. Субстрат-субстратная активация в реакциях, катализируемых пероксидазой хрена // Изв. РАН. Серия хим. — 1996. — № 1. — С. 25–32.
4. Лебедева О.В., Угарова Н.Н., Березин И.В. Кинетическое изучение реакции окисления о-дианизидина перекисью водорода в присутствии пероксидазы из хрена // Биохимия. — 1977. — Т. 42. — № 8. — С. 1372–1379.
5. Лебедева О.В., Угарова Н.Н., Березин И.В. Совместное окисление ферроцианида калия и о-дианизидина перекисью водорода, катализируемое пероксидазой хрена. Субстрат-субстратная активация // Биохимия. — 1981. — Т. 46. — № 7. — С. 1202–1209.
6. Рогожин В.В., Верхотуров В.В. Аскорбиновая кислота — медленно окисляемый субстрат пероксидазы хрена // Биохимия. — 1997. — Т. 62. — № 12. — С. 1678–1682.
7. Рогожин В.В., Верхотуров В.В. Влияние антиоксидантов (дигоксина, кверцетина и аскорбиновой кислоты) на каталитические свойства пероксидазы хрена // Биохимия. — 1998. — Т. 63. — № 6. — С. 781–786.
8. Рогожин В.В., Верхотуров В.В. Стационарная кинетика совместного пероксидазного окисления гидрохинона и о-дианизидина в присутствии пероксидазы хрена // Биохимия. — 1999. — Т. 64. — № 2. — С. 219–224.
9. Угарова Н.Н., Лебедева О.В., Савицкий А.П. Пероксидазный катализ и его применение. — М.: МГУ, 1981. — 92 с.
10. Falk J.E. Porphyrins and Metalloporphyrins. — Amsterdam. N.Y.-London etc.: Elsevier, 1964. — 236 p.
11. George P. The chemical nature of the second hydrogen peroxide compound formed by cytochrome c peroxidase and horseradish peroxidase. 1. Titration with reducing agents // Biochem. J. — 1953. — Vol. 54. — N 2. — P. 267–276.
12. Ogawa S., Shira Y., Morishima I. Calcium binding by horseradish peroxidase C and the heme environmental structure // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1979. — Vol. 90. — N 2. — P. 674–678.

KINETICS OF COMBINED OXIDATION OF DIHYDROQUERCETIN AND O-DIANISIDINE BY HYDROGEN PEROXIDE IN THE PRESENCE OF HORSERADISH PEROXIDASE

V.V. ROGOZHIN, D.V. PERETOLCHIN

Yakutsk State Agricultural Academy, Yakutsk, Republic Sakha (Yakutia)

Studied the kinetics of steady-state co-oxidation of o-dianisidine and dihydroquercetin or quercetin and hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase. Shown that the joint presence in a reaction medium dihydroquercetin and o-dianisidine oxidation differentially. Oxidation of o-dianisidine not observed until complete conversion dihydroquercetin at pH 4,5–8,0. The mechanisms of inhibition of peroxidase dihydroquercetin in oxidation reactions of o-dianisidine was studied. Furthermore, studies peroxidase oxidation of quercetin revealed that he is slowly oxidized substrate of peroxidase. When coupled with the oxidation of o-dianisidine and quercetin at pH 4,5–7,0 observed competitive type of inhibition quercetin peroxidase oxidation of o-dianisidine, and at $\text{pH} \geq 7,5$ manifested noncompetitive type of inhibition.

Keywords: horseradish peroxidase, dihydroquercetin, quercetin, o-dianisidine, antioxidants, enzyme kinetics.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ГИДРОЛИЗАТА КАЗЕИНА НА БИОСИНТЕЗ АНАБАЗИНА В УСЛОВИЯХ IN VITRO

А.П. АНДРЕЕВА*

Карагандинский государственный медицинский университет Караганда, Республика Казахстан

В исследовании оценивали степень влияния органических добавок на биосинтез анабазина в культуре клеток *A. aphylla L.* в условиях in vitro.

Ключевые слова: анабазис безлистный, анабазин, органические добавки, культура растительных клеток.

Анабазис безлистный (*Anabasis aphylla L.*) является единственным источником нового антигрибкового препарата «Антилишай», разработанного на основе пиперидинового алкалоида — анабазина. Анабазин обладает ярко выраженной избирательной противотрихофитиной активностью. Препарат прошел клинические испытания и показал эффективность при лечении грибковых заболеваний молодняка крупного рогатого скота. Разработка технологического регламента биотехнологического производства анабазина в условиях in vitro позволит заложить основу для создания сырьевой базы препарата «Антилишай».

Культура клеток анабазиса служит источником алкалоида анабазин [1]. Биосинтез и накопление продукта зависят от степени вторичной дифференцировки каллусной ткани и наличия в составе питательной среды ряда промежуточных продуктов метаболизма анабазина: лизина и витаминов группы В. Известно, что процесс биосинтеза алкалоидов начинается с появления в культуре морфогенных структур, ответственных за вторичный метаболизм. Первые этапы метаболизма анабазина начинаются с аспартата, затем образуется промежуточный продукт L-лизин. Реакция превращения L-4-аспартилфосфата в L-аспарат 4-семиальдегид идет с участием аспартатсемиальдегиддегидрогеназы, коферментом является рибофлавин [2, 3]. Образование конечного продукта метаболизма алкалоида анабазин зависит от количества лизина — исходного продукта реакции.

Важное биологическое значение лизина было открыто Drechsel (1889). Он сформулировал гипотезу о том, что концентрация лизина вызывает существенное изменение в биохимических процессах живых организмов [4]. Недостаток лизина в растительных клетках сопровождается низкой продуктивностью биохимических превращений. Гипотеза Drechsel получила убедительное подтверждение в работах В.Л. Кретовича и сотр. (1958—1997) [5, 6]. Развивая исследования в данном направлении, сотрудники этой лаборатории убедительно показали, что биосинтез лизина высшими растениями осуществляется через диаминопимелиновую кислоту, которая включена в цикл метаболизма аспартата. Таким образом, лизин является ключевой аминокислотой в процессе биосинтеза вторичных метаболитов в культуре клеток анабазиса.

Обращает на себя внимание тот факт, что все вышеперечисленные вещества (диаминопимелиновая кислота, аспартат, лизин) являются физиологическими метаболитами растительной клетки, но в процессе дедифференцировки могут быть утрачены. Поэтому важно правильно сформировать алгоритм и условия культивирования.

Было высказано предположение, что для получения штамма-продуцента анабазина в культуре клеток анабазиса важную роль играют факторы химической природы, такие как органические добавки — гидролизат казеина (источник лизина) и витамины группы В.

Цель проведенного исследования — оценить степень влияния органических добавок на биосинтез анабазина в культуре клеток *Anabasis aphylla L.* в условиях in vitro.

Для получения первичной культуры клеток анабазиса был использован семенной материал, полученный на опытном поле Юго-Западного НИИ сельского хозяй-

© 2010 г. Андреева А.П.

* Автор для переписки:

Андреева А.П.

Карагандинский государственный медицинский университет
Республика Казахстан, Караганда, ул. Гоголя, 40

E-mail: andreewa.anyuta2010@yandex.kz

ства г. Шимкент (Казахстан). Проращивание семенного материала проводили на питательной среде Мурасиге и Скуга (далее — М-С).

Оптимальные концентрации макросолевого состава в питательной среде М-С: KNO_3 — 3800 мг/л, NH_4NO_3 — 1600 мг/л и KH_2PO_4 — 340 мг/л. Фитогормональный баланс 2,4Д — 2,15 мг/л, кинетин — 1,75 м/л.

Результаты изучения и подбора оптимальных условий культивирования *A. aphylla* показали, что для культивирования *in vitro* наиболее пригоден гипокотиль стерильных проростков. В экспериментах по оптимизации концентрации органических добавок питательной среды использован математический метод «Нетрадиционный метод построения многомерных моделей на ПЭВМ по программе ANETR 21», разработанный профессором М.А. Ермаковым [7, 8]. Для выращивания растительных клеток *A. aphylla* использован двухэтапный режим культивирования. На первом этапе происходит накопление каллусной массы, а второй этап культивирования продолжается на продуцирующей среде, что позволяет сдвинуть вектор культивирования в сторону биосинтеза анабазина.

Большинство тканей, культивируемых *in vitro*, способно к синтезу всех нужных для жизнедеятельности витаминов, но их количества недостаточно для выполнения метаболических функций. Поэтому дополнительное внесение витаминов в питательную среду стимулирует рост тканей и биосинтез вторичных метаболитов.

Витамины необходимы для физиологических процессов растительных клеток в условиях *in vitro*. Культивируемая ткань на среде с витаминами становится более плотной, компактной, напоминая характером роста нормальную ткань интактного растения.

Мезоинозит устойчив к действию света и обладает термостойкостью. Активирует рост клеток и индуцирует генез почек камбием у древесных пород. Мезоинозит содержится в так называемой нейтральной фракции кокосового молока, которая сама по себе не стимулирует рост растительной ткани, но значительно усиливает действие активной фракции.

Планирование и анализ экспериментов по влиянию органических добавок также проводились по рекомендуемой матрице рационального планирования для 25 опытов в диапазоне концентраций.

Результаты оптимизации условий культивирования показали, что витамины мало влияют на рост культуры каллусной ткани (витамина В1 — 1 мг/л (ростовой индекс — РИ=105,3%), гидролизат казеина — 2,0 мг/л (РИ=108,9%)), но являются важным компонентом

питательной среды для биосинтеза анабазина. Наряду с оптимальными концентрациями макро- и микроэлементов в питательной среде витамины группы В являются кофактором аспартаткиназы — ключевого фермента синтеза лизина, деривата анабазина.

Отсутствие витамина В6 значительно снижает влияние витамина В1 на рост каллусной ткани *A. aphylla*. Влияние гидролизата казеина на увеличение синтеза анабазина показывает, что данное вещество является важным фактором, активизирующим биосинтез анабазина (гидролизат казеина — 1 мг/л, количество анабазина составляло 0,8 на 100 мг сухого веса). Максимальный ростовой индекс был получен при содержании мезоинозита 500 мг/л (РИ=109,7%).

Данные, полученные при анализе результатов этого эксперимента, показывают, что по силе влияния, оказываемого на рост биомассы, добавки расположились в следующем порядке: мезоинозит — тиамин-НСI — гидролизат казеина — пиридоксин-НСI — глицин. Существенное влияние на накопление анабазина в исследованном диапазоне концентраций оказал только глицин. Остальные компоненты не оказывали существенного влияния на содержание искомого продукта.

Полученные нами результаты имеют важное практическое значение для использования культуры клеток анабазиса безлистного как источника алкалоида анабазина в производстве высокоэффективного анти-трихофитозного препарата.

Принимая во внимание две функции (ростовой индекс, биосинтез анабазина), которые выступают в роли главных критериев оценки влияния органических добавок, хотелось бы заметить, что по степени активности и необходимости рассматриваемые добавки имеют разное значение. Концентрация гидролизата казеина варьирует в широких пределах, наибольший ростовой индекс 108,9% в 18-м ряду математической матрицы при концентрации 2,5 мг/л. Уровень анабазина достигает значения 0,8 на 100 мг сухого веса каллусов при концентрации гидролизата казеина 1,0 и 2,5 мг/л. Таким образом, культивирование растительных клеток *Anabasis aphylla L.* на агаризованной питательной среде М-С с добавлением гидролизата казеина достоверно не увеличивает синтез и накопление алкалоида анабазина.

Литература

1. Газалиев А.М., Журинов М.Ж., Фазылов С.Д. Новые биоактивные производные алкалоидов. — Алма-Ата, 1992. — 125 с.

2. Садыков А.С. Химия алкалоидов *Anabasis aphylla*. — Ташкент, 1950. — 160 с.
3. Насыров С.Х., Хазбиевич И.С. Фармакология алкалоидов *Anabasis aphylla*. — Ташкент, 1982. — 160 с.
4. Лиепиньш Г.К., Дунце М.Э. Сырье и питательные субстраты для промышленной биотехнологии. — Рига: Знание, 1986. — 156 с.
5. Кретович В.Л. Биохимия растений. — М.: Высшая школа, 1980. — 445 с.
6. Кретович В.Л. Усвоение и метаболизм азота у растений. — М.: Наука, 1987. — 542 с.
7. Ермеков М.А., Махов А.А. Статистико-детерминированный метод построения многомерных моделей с использованием ЭВМ. — Караганда, 1988. — 57 с.
8. Ермеков М.А., Махов А.А. Нетрадиционный метод построения многомерных моделей на ПЭВМ по программе ANETR98. — Караганда.: КарПТИ, 1998. — 20 с.

ASSESSING THE IMPACT OF CASEIN HYDROLYZATE IN THE BIOSYNTHESIS OF ANABASINE IN VITRO

A.P. ANDREYEVA

Karaganda State Medical University, Kazakhstan

In a study to assess the impact of organic additives on the biosynthesis of anabasine in cell culture *A. aphylla* L. in conditions in vitro.

Keywords: anabasis leafless, anabasine, organic additives, the culture of plant cells.

ВЛИЯНИЕ ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ НА ДЕГРАДАЦИЮ КРАХМАЛА ПОД ДЕЙСТВИЕМ АМИЛАЗ

Д.В. ТАРАБУКИН^{1*}, М.А. ТОРЛОПОВ²

¹ Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН,

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

Исследовали влияние добавок полусинтетических полисахаридов (хитозан, карбоксиметилхитозан, сульфат хитозана, дезоксиаминобутилцеллюлоза) на процесс ферментативного гидролиза крахмала эндоамилазами препарата амилосубтилин ГЗх и экзоамилазами препарата глюкаваморин ГЗх с целью расшифровки механизма действия указанных выше добавок для ускорения или замедления процесса гидролиза крахмала. Показано, что присутствие в реакционной среде хитозана и дезоксиаминобутилцеллюлозы уменьшает накопление продуктов гидролиза под действием эндоамилаз препарата амилосубтилин ГЗх. Присутствие в реакционной среде производных хитозана, содержащих в структуре электроотрицательную группу (карбоксиметилхитозан, сульфат хитозана), в наибольшей мере снижает накопление продуктов гидролиза при действии экзоамилазного комплекса препарата глюкаваморин ГЗх.

Ключевые слова: полиэлектролиты, растительные полисахариды, модификация полисахаридов, амилазы, ферментативный гидролиз, ингибирование.

С целью создания биodeградируемых материалов наибольшее применение находят крахмал и его химические производные [1]. Для улучшения механических свойств биodeградируемых пленок и пластиков, модификации гидрореологических свойств гидрогелей на основе крахмала в качестве добавок вводят различные соединения, в том числе высокомолекулярные. С этой точки зрения практический интерес представляет получение композиций на основе крахмала и водорастворимого хитозана (ХТ) [2], а также, по-видимому, его производных. Композиции на основе крахмала, содержащие ХТ, обладают, помимо прочего, антибактериальной активностью [3, 4, 5].

ХТ представляет собой линейный β -1 \rightarrow 4 связанный полисахарид с аминодезоксигруппами при втором углеродном атоме элементарного звена [6, 7], которые придают макромолекуле ХТ свойства полииона.

Поскольку в процессе биodeградации подобных материалов участвуют главным образом ферменты, а

аминокислотная цепь фермента способна к образованию электростатических многоточечных связей с полиионами [8], влияние ХТ и его производных на процессы ферментативной деструкции композитных материалов на основе крахмала может быть значительным и на данный момент не изучено. Из этого следует, что практическая значимость исследования влияния ХТ и его производных на ферментно-катализируемые процессы напрямую связана с расширением возможностей применения композитных биodeградируемых материалов на основе крахмала для производства пленок, пластиков и гидрогелей, а также прогнозирования и регулирования их устойчивости к биодеструкции в процессе применения и последующей биотехнологической переработки.

Цель данной работы — расшифровка механизма действия хитозана и его производных на процессы ферментативного гидролиза крахмала под действием различного типа амилаз.

В работе использовали ХТ (степень деацетилирования 0,86, мол. м. $200 \cdot 10^3$) производства ЗАО «Биопрогресс», ТУ 0289 002 11418234-99, хлопковую микрокристаллическую целлюлозу производства АО «Полиэкс» (г. Бийск) с мол. м. $36 \cdot 10^3$ (определение в кадоксене).

Источником амилаз служили ферментные препараты отечественного производства (Сиббиофарм): амилосубтилин ГЗх (α -амилазная активность 600 ед/г) и глюкаваморин ГЗх (глюкоамилазная активность 400 ед/г).

© 2010 г. Тарабукин Д.В., Торлопов М.А.

* Автор для переписки:

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

В качестве субстрата для амилаз использовался крахмал растворимый, марки чда в количестве 100 мг на 10 см³ дистиллированной воды. Раствор крахмала перед введением ферментных препаратов и дезоксиаминополисахаридов активировали кипячением в течение 5 мин., затем охлаждали.

Ферментативный гидролиз крахмала проводили при 50 °С, в закрытых бюксах. Растворы ферментных препаратов перед введением в реакционный объем пропускали через микропористую мембрану с диаметром пор 0,2 мкм. Содержание препарата амилосубтилин ГЗх в реакционной среде составляло 0,333% от массы крахмала, препарата глюкаваморин ГЗх — 1% от массы крахмала. Навеска дезоксиаминополисахарида в реакционной среде составляла 1% от массы крахмала.

Влияние аминополисахаридов (АП) на ферментативный гидролиз крахмала оценивали по накоплению восстанавливающих сахаров (ВС) в реакционном объеме в динамике. Содержание ВС определяли по методу Шомоди—Нельсона [9]. В экспериментах с применением глюкозамина (ГА) динамику накопления ВС рассчитывали с учетом начального содержания сахаров, получаемых после введения аминопроизводного глюкозы.

В работе использованы несколько типов АП. Прежде всего, ХТ — дезацетилованное производное хитина, построенное из остатков 2-дезоксиаминоглюкозы [6]. В отличие от хитина, ХТ способен растворяться в воде после образования соли с уксусной, соляной и некоторыми другими кислотами. В солянокислой форме использовали также и ГА.

Дополнительно нами синтезированы и исследованы производные ХТ, содержащие сульфатную и карбоксильную группу (СХТ, КМХ, соответственно). Эти производные, содержащие одновременно аминогруппу и остаток кислоты, представляют собой амфолитные соединения. СХТ содержит сульфатную группу — полуэфир более сильной серной кислоты — и синтезирован нами по оригинальной методике, предусматривающей этерификацию гидроксильных групп только при С6 и С3 атомах элементарного звена. При использовании этого метода аминогруппа при С2 атоме не подвергается этерификации. Таким образом, статистическое звено СХТ содержит и положительно заряженную аминогруппу, и сульфатную группу (в виде натриевой соли), обладающую отрицательным зарядом.

Кроме ХТ и его производных, для возможности сравнения свойств особый интерес представляет использование синтетических АП, иной структуры, прежде всего с иным пространственным расположением амино-

группы в элементарном звене. С этой целью нами был синтезирован АП на основе целлюлозы. По строению целлюлоза близка к ХТ, за исключением отсутствия аминогруппы при С2 атоме элементарного звена. Введение аминогруппы, непосредственно связанной с углеродным атомом элементарного звена, удобнее всего осуществлять по реакции нуклеофильного замещения тозилатов целлюлозы или ее галогенпроизводных. Получаемая в итоге аминобутилдезоксигалогенцеллюлозу (АБЦЛ) проявляет обычные свойства аминополисахаридов: способность к солеобразованию и растворимость в воде в виде солей с такими кислотами, как уксусная и соляная. В отличие от ХТ и его производных, аминогруппа АБЦЛ находится преимущественно у С6 — углеродного атома статистического звена целлюлозы и, частично, при С2 атоме (с обращением конфигурации последнего).

Получение производных АП. Растворимый ХТ в виде солянокислой соли получали обработкой ХТ 10%-ным раствором концентрированной соляной кислоты в этаноле. Полимер отделяли, промывали этанолом до нейтральной реакции и сушили при 70 °С в вакууме.

Полученный растворимый ХТ имел ИК-спектр в (KBr) ν_{max} см⁻¹: 3439, 3363 (ОН, NH₂) 2873 (CH₂), 1658, 1595 (амид I, II); ЯМР-спектр (¹³C, D₂O): δ 56,4 (C2), 60,6 (C6), 70,2–76,9 (C3–C4), 98,0 (C1), 175,2 (C=O).

СХТ синтезировали обработкой соли толуолсульфокислоты и ХТ — аминсульфоновой кислотой в ДМФА. Полученный СХТ имел следующие характеристики: 1) ИК-спектр в (KBr) ν_{max} см⁻¹: 3602, 2968, 1631, 1143 (S-O), 813 (C-OS); 2) ЯМР-спектр (¹³C, D₂O): δ 57,3 (C2), 67,1 (C6-OSO₃), 73,1–78,7 (C3–C4), 103,1 (C1), 167,2 (C=O).

КМХ синтезировали по методу [10]. Полученную натриевую соль КМХ обрабатывали 10%-ным раствором концентрированной соляной кислоты в этаноле. Полимер отделяли, промывали водным этанолом до нейтральной реакции и сушили при 70 °С в вакууме. КМХ содержит остаток гликолевой кислоты, более слабой, чем серная. Этот тип амфолитного производного хитозана использован нами в виде солянокислой соли, карбоксильная группа которого представлена в свободном виде.

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

АБЦЛ синтезировали из тозилата целлюлозы. Тозилат целлюлозы растворяли в ДМФА, после чего

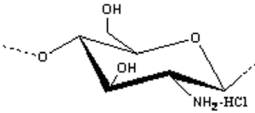
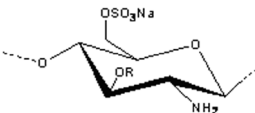
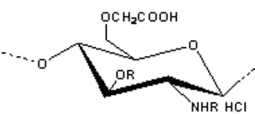
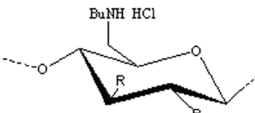
прибавляли пятикратный (в расчете на ангидроглюкозное звено) избыток бутиламина и выдерживали смесь при температуре 90 °С в течение 48 ч. Полимер осаждали этанолом, промывали этанолом, затем ацетоном. Солянокислую соль АБЦЛ получали способом, описанным выше для ХТ. Полученный продукт имел следующие характеристики: 1) ИК-спектр в (KBr) ν_{\max} см⁻¹: 2954,

(R₂NH), 1597 (NH), сл. 770–816 (деформ. колебания C–H связи ароматического кольца), сл. 1359, 1175 см⁻¹ (SO₂-O); 2) ЯМР-спектр (¹³C, DMSO d₆): δ 13,98, 20,01, 38,6–40,3, 73,8, 98,9, 102,5, 126–130,2.

В таблице 1 суммированы основные характеристики АП, с которыми проводилась исследовательская работа.

Таблица 1

Аминосодержащие полисахариды и их характеристика

Аминопполисахарид, индекс	Исходный полисахарид	Основное структурное звено	Заместитель R	Степень замещения
ХТ	Хитозан		—	1,0
СХТ	Хитозан		H, SO ₃ Na	1,1
КМХ	Хитозан		H, CH ₂ COOH	0,8
АБЦЛ	Целлюлоза		ОН, NHBu	1,2

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

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

Проведенные исследования по воздействию эндоамилаз препарата амила субтилин ГЗх на крахмал без добавок АП показали, что происходят быстрая деполимеризация макромолекул крахмала и ускоренное накопление ВС в реакционной среде (рис. 1). Однако процесс гидролиза фактически выходит на стационарный уровень после часа гидролиза, вероятно, вследствие недостаточного количества фермента, способного расщеплять 1,6- α -связи крахмала.

Как видно из рисунка 1, присутствие в реакционной среде ХТ и АБЦЛ в наибольшей мере сказывается на уменьшении скорости накопления продуктов гидролиза.

Фактически процесс останавливается после добавления в реакционную среду данных полисахаридов. В то же время СХТ и КМХ меньше влияют на процесс ферментативного гидролиза крахмала. Характер накопления продуктов гидролиза при наличии данных соединений в реакционной среде в целом сходен с гидролизом без добавления АП.

Влияние добавок АП на гидролиз крахмала и выход ВС препаратом глюкаваморин ГЗх показано на рисунке 2. Как видно из этого рисунка, присутствие в реакционной среде КМХ и особенно СХТ наиболее выражено сказывается на уменьшении выхода ВС, однако полного прекращения процесса гидролиза не наблюдается. Также следует отметить значительное уменьшение выхода ВС в случае добавки в среду АБЦЛ, химическая структура которой отличается от ХТ. Кривые накопления ВС при использовании глюкаваморина ГЗх имеют более пологий вид ввиду того, что превалирующий фермент глюкоамилаза при незначительной эндоамилазной активности в препарате обеспечивает постоянную скорость накопления продуктов гидролиза за весь период реакции.

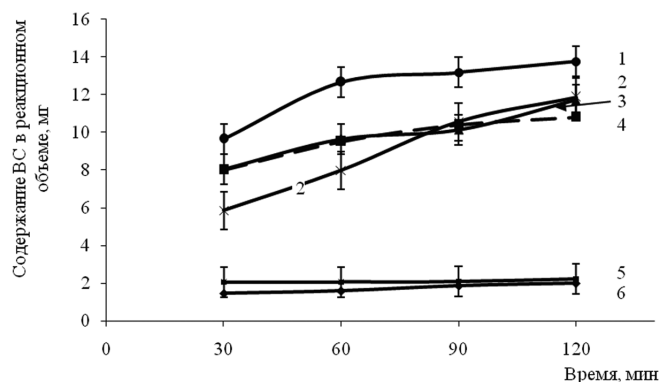


Рис. 1. Накопление продуктов гидролиза крахмала под воздействием эндоамилаз препарата амилосубтилин ГЗх (1 – без добавки АП, 2 – КМХ, 3 – СХТ, 4 – ГА, 5 – АБЦЛ, 6 – ХТ)

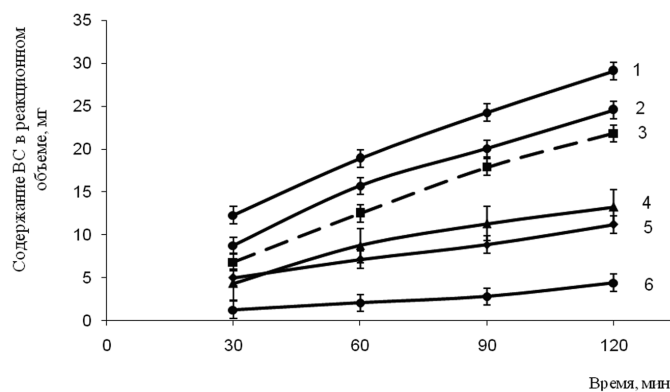


Рис. 2. Накопление продуктов гидролиза крахмала под воздействием экзоамилаз препарата глюкаваморин ГЗх (1 – без добавки АП, 2 – ХТ, 3 – ГА, 4 – АБЦЛ, 5 – КМХ, 6 – СХТ)

Результаты ферментативного гидролиза крахмала с добавками различных АП показывают, что данные соединения в большей или меньшей степени тормозят накопление продуктов гидролиза крахмала, то есть ингибируют реакцию ферментативного гидролиза крахмала. В ряду исследованных АП: ХТ, АБЦЛ, КМХ, СХТ ингибирующая способность убывает от ХТ к СХТ в случае использования препарата амилосубтилин ГЗх и возрастает от СХТ к ХТ при использовании препарата глюкаваморин ГЗх.

Отдельно следует отметить значительно более выраженное торможение процесса ферментативного гидролиза крахмала в присутствии ХТ, содержащего остатки ГА, по сравнению с ГА-мономером в случае воздействия на субстрат эндоамилаз препарата амилосубтилин ГЗх. При воздействии на субстрат экзоамилаз препарата глюкаваморин ГЗх наблюдается более сильный ингибирующий эффект ГА-мономера по сравнению с полимером ХТ.

Основываясь на этих результатах, можно заключить, что более высокая ингибирующая способность исследованных полисахаридов, по сравнению с низкомолекулярным аналогом, объясняется способностью АП к многоточечному электростатическому взаимодействию с гидрофильными аминокислотными остатками на поверхности белковой макромолекулы ферментов. Термодинамическая стабильность комплексов, образованных соединениями в полимерном состоянии и связанных многоточечными связями, выше, чем для их мономерных предшественников, то есть наблюдается эффект кооперативных взаимодействий [11].

Сравнивая ингибирующую способность АП по отношению к ферментным препаратам, можно заключить, что КМХ и СХТ обладают более высоким сродством к экзоамилазам препарата глюкаваморин ГЗх по сравнению с ХТ и АБЦЛ. Данный факт мы связываем с наличием в структуре КМХ и СХТ электроотрицательных групп – карбоксильной и сульфатной, соответственно. Отсюда можно сделать вывод, что ингибирующая способность этих ионогенных полисахаридов в данном случае, по-видимому, связана с многоточечным взаимодействием между ними и положительно заряженными участками аминокислотной последовательности ферментов.

Напротив, более высокая ингибирующая способность по отношению к амилосубтилону ГЗх полисахаридов ХТ и АБЦЛ, не содержащих дополнительных электроотрицательных групп, по-видимому, связана с образованием электростатических связей между положительно заряженной цепью полисахаридов и противоположно заряженной аминокислотной последовательностью (ее участками) эндоамилаз, с изменением пространственной структуры последних. Результатом такого электростатического взаимодействия может быть нарушение структуры фермента и потеря им вследствие этого активности по отношению к субстрату [8].

Значительное различие в ингибирующей способности ХТ и АБЦЛ при использовании препарата глюкаваморин ГЗх, по нашему мнению, объясняется, во-первых, структурным фактором: расположением аминной группы у ХТ при С2 углеродном атоме элементарного звена и преимущественно при С6 углеродном атоме элементарного звена у АБЦЛ (при общей структурной схожести полимерного остова). Во-вторых, тем, что аминогруппы АБЦЛ соединены с гидрофобным заместителем – бутильным радикалом (C_4H_{11}). Последний фактор имеет значение в гидрофобных взаимодействиях между полимером-ингибитором и аминокислотной цепью, облегчающих встраивание полисахарида в структуру фермента.

Различия в ингибирующей способности между СХТ и КМХ могут быть вызваны разницей в отрицательном заряде макромолекул этих производных. При одинаковой природе полимерного остова и сходных степенях замещения СХТ содержит остаток более электроотрицательной группы, что может способствовать более сильному воздействию на активность фермента.

Таким образом, нами экспериментально доказано, что ферментативный гидролиз крахмала амилазами подавляется при добавлении АП к реакционной смеси. В целом, АП, независимо от типа аминогруппы и ее положения в элементарном звене, подавляют эндоамилазную активность препарата амилосубтилин ГЗх. Введение дополнительной анионной функциональной группы в макромолекулу АП уменьшает ингибирующую способность АП по отношению к эндоамилазам препарата амилосубтилин ГЗх и повышает по отношению к экзоамилазам препарата глюкаваморин ГЗх.

На основе полученных результатов нами сделано предположение, что ингибирующая способность АП связана с электростатическим взаимодействием между ними и аминокислотной цепью ферментов. Полученные результаты имеют значение для создания и регулирования устойчивости композитных материалов к ферментативному гидролизу, а также для переработки различных биodeградируемых композитных материалов на основе крахмала, хитозана и их производных.

Литература

1. Lucia L.A., Argyropoulos S., Ban W. Modifying the functionality of starch films with natural polymers // *Materials, chemicals, and energy from Forest Biomass*. – 2007. – Chapter 13. – P. 200–218.
2. Niño K.A., Gordon S.H. Extruded plastics containing starch and chitin: physical properties and evaluation of biodegradability // *Biopolymers*. – 1999. – Chapter 12. – P. 195–203.
3. Pealissri F.M., Grossmann M.V., Yamashita F. Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil // *J. Agric. Food Chem.* – 2009. – Vol. 57(16). – P. 7499–7504.
4. Suzuki S., Shimahashi K., Takahara J. Effect of addition of water-soluble chitin on amylose film // *Biomacromolecules*. – 2005. – Vol. 6(6). – P. 3238–3242.
5. Serrero A., Trombotto S., Cassagnau P. Polysaccharide gels based on chitosan and modified starch: Structural characterization and linear viscoelastic behavior // *Biomacromolecules*. – 2010. – Vol. 11(6). – P. 1534–1543.
6. Пестов А.В., Ятлук Ю.Г. Карбоксиметилированные производные хитина и хитозана. – Екатеринбург: УрО РАН, 2007. – 102 с.
7. Ravi Kumar M.N., Muzzarelli R.A., Muzzarelli C. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives // *Chem. rev.* – 2004. – Vol. 104. – No 12. – P. 6017–6084.
8. Сабурова Е.А., Бобрешова М.Е., Елфимова Л.И. Ингибиторное действие полиэлектролитов на олигомерные ферменты // *Биохимия*. – 2000. – Т. 65. – № 8. – С. 1151–1161.
9. Полюгалина Г.В., Чердниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов. Справочник. – М.: ДеЛи принт, 2003. – С. 321.
10. Chen L.Y., Zeng X. Relationships between the molecular structure and moisture-absorption and moisture-retention abilities of carboxymethyl chitosan II. Effect of degree of deacetylation and carboxymethylation // *Carbohydrate Research*. – 2003. – Vol. 338(4). – P. 333–340.
11. Izumrudov V.A., Galaev I.Y. Polycomplexes – potential for bioseparation // *Bioseparation*. – 1999. – Vol. 7(4–5). – P. 207–220.

INFLUENCE OF CHITOSAN AND ITS DERIVATIVES ON THE DEGRADATION OF STARCH UNDER THE ACTION OF AMYLASES

D.V. TARABUKIN¹, M.A. TORLOPOV²

¹*Institute of Biology (Komi Science Centre, UB RAS),*

²*Institute of Chemistry (Komi Science Centre, UB RAS), Syktyvkar, Komi Republic*

The influence of additives semisynthetic polysaccharides (chitosan, carboxymethylchitosan, chitosan sulphate, deoxyaminebutylcellulose) on the process of enzymatic hydrolysis of starch the Amilosubtilin G3x endoamylases and the Glucawamorin G3x exoamylases have been investigated. It is shown that the presence in the reaction medium chitosan and deoxyaminebutylcellulose reduces the accumulation of products of hydrolysis under the action of the Amilosubtilin G3x endoamylases. The presence in the reaction medium chitosan derivatives containing in the structure of electronegative group (carboxymethylchitosan, chitosan sulphate) reduces the accumulation of hydrolysis products during the action of the Glucawamorin G3x exoamylases to the greatest extent.

Keywords: polyelectrolytes, plant polysaccharides, modification of polysaccharides, amylases, enzymatic hydrolysis, inhibition.

КРАТКИЙ ОБЗОР СОВРЕМЕННОГО СОСТОЯНИЯ И ПЕРСПЕКТИВНЫХ НАПРАВЛЕНИЙ РАЗВИТИЯ ПРОИЗВОДСТВА И ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ

И.В. КРАСИЛЬНИКОВ, А.К. ЛОБАСТОВА, К.А. ЛЫСКО*

ФГУП «НПО Микроген» МЗ РФ, Москва

В обзоре рассматривается проблема клинического применения бактериофагов в современной медицине. Акцент делается на потенциале отечественных научных и практических учреждений, главным образом ФГУП «НПО Микроген» МЗ РФ.

Ключевые слова: бактериофаги, производство, клиническое применение.

Многолетнее применение антибиотиков для лечения различных заболеваний бактериальной этиологии привело к тому, что многие патогенные и условно-патогенные микроорганизмы приобрели множественную лекарственную устойчивость (т.н. multi drug resistant strains). Разработка нового препарата антибиотика, его клинические испытания и регистрация занимают многие годы, а применение антибиотиков в клинической практике, помимо общеизвестных побочных эффектов (иммунодепрессивное действие, токсические и аллергические реакции, дисбактериоз кишечника), влечет за собой, опять же, возникновение форм бактерий, устойчивых к вновь синтезированным препаратам. По данным Ассоциации инфекционных заболеваний Америки (Infectious Diseases Society of America), стоимость полного цикла от разработки антибиотика до вывода нового препарата на рынок составляет 800 миллионов долларов США. Следует также отметить, что количество новых препаратов антибиотиков неуклонно сокращается. Так, в США за период с 1991 по 1995 гг. Управлением по контролю за продуктами и лекарствами Соединенных Штатов Америки (US Food and Drug Administration, FDA) было одобрено 26 препаратов, в то время как с 2000 по 2003 гг. всего 3 [1]. Экономический ущерб, наносимый возникновением антибиотикорезистентных форм бактерий, исчисляется десятками и сотнями миллионов долларов.

Например, в США уже в конце прошлого столетия он составил порядка 4 миллиардов долларов США в год [2]. В сложившейся ситуации достойную альтернативу антибиотикам в терапии множества заболеваний бактериального происхождения способны составить бактериофаги (фаги), открытые почти столетие назад.

Бактериофаги представляют собой вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки. Антибактериальный эффект препаратов бактериофагов обусловлен внедрением генома фага в бактериальную клетку с последующим его размножением и лизисом инфицированной клетки. Вышедшие во внешнюю среду в результате лизиса бактериофаги повторно инфицируют и лизируют другие бактериальные клетки, действуя до полного уничтожения патогенных бактерий в очаге воспаления.

На Западе реального успеха применение бактериофагов не имеет, хотя сейчас предпринимаются некоторые усилия в этом направлении. К примеру, в 2006 году Управление по контролю за продуктами и лекарствами США разрешило использование бактериофагов *Listeria monocytogenes* в качестве антибактериального компонента в сырах, а в 2007 г. — во всех готовых к употреблению продуктах [3]. На протяжении последних нескольких лет многие биотехнологические компании в Финляндии, Канаде, США, Великобритании, Израиле и других странах начали исследования в области разработки лекарств на основе бактериофагов. Например, первые результаты применения препарата на основе бактериофагов и полимера пролонгированного действия PhagoBioDerm (Intralytix Inc., США) для терапии различных бактериальных инфекций ран, ожогов, пролежней и др. были опубликованы в 2002 году. В 2007 году специалисты Novolytics Limited (Соединенное Королевство) начали

© 2010 г. Красильников И.В., Лобастова А.К., Лыско К.А.

* Автор для переписки:

Лыско Ксения Андреевна, к.т.н., главный специалист
отдела новых технологий и инновационных проектов,
ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ,
115088 Москва, ул. 1-я Дубровская, 15
Тел./факс: 8 (495) 710-37-83
E-mail: lysko@bio.ru

работы по созданию интраназальных мази и капель для профилактики и лечения внутригоспитальных инфекций, вызываемых метициллин-резистентными *Staphylococcus aureus* (MRSA); начало клинических исследований данных препаратов запланировано на 2009 год. В 2008 году была завершена фаза II клинических исследований поливалентного препарата бактериофагов Biophage-PA (Biocontrol Limited, Соединенное Королевство/США), показавшая его эффективность и безопасность. Препарат предназначен для терапии хронических отитов, вызываемых антибиотикорезистентными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* [4, 5, 6, 7, 8].

Исторически сложилось, что СССР занимал лидирующие позиции в области производства и применения лечебно-профилактических бактериофагов. Так, в филиалах ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ в городах Уфа, Пермь и Нижний Новгород бактериофаги производятся с 40-х годов прошлого века. В России и странах СНГ препараты бактериофагов применяют для профилактики и лечения:

- инфекционных поражений желудочно-кишечного тракта (дизентерия, брюшной тиф, сальмонеллез, дисбактериоз и др.);

- гнойно-воспалительных заболеваний глаз, ушей, носа, ротовой полости, горла, легких (отит, ангина, фарингит, стоматит, пародонтит, конъюнктивит, гайморит, фронтит, пневмония и др.);

- хирургических инфекций (обработка послеоперационных и гноящихся ран, гнойные поражения кожи, перитонит и др.);

- ожоговых ран;

- урогенитальных инфекций (цистит, пиелонефрит, вульвит и др.) и других заболеваний (табл. 1).

Традиционной формой выпуска бактериофагов является жидкий препарат, за исключением таблетированных форм кишечных фагов. Поэтому фаги используют для приема через рот, в виде клизм, аппликаций, орошений, введения в полости ран, носа, влагалища, матки, а также путем введения в дренированные полости — брюшную, плевральную, мочевого пузыря, почечной лоханки.

Препараты бактериофагов (см. табл. 1) используются в клинической практике наряду с антибиотиками, причем не уступая им, а в некоторых случаях даже превосходя их по активности в отношении антибиотикорезистентных возбудителей. Бактериофаги не вызывают побочных токсических и аллергических реакций и не имеют противопоказаний. Кроме того, они применяются при лечении ряда заболеваний беременных женщин в сочетании с другими лечебными препаратами [9, 10, 11, 12].

Использование препаратов бактериофагов стимулирует активизацию факторов специфического и неспецифического иммунитета [13]. Поэтому фаготерапия особенно эффективна при лечении хронических воспалительных заболеваний на фоне иммунодепрессивных состояний. Следует отметить, что бактериофаги не препятствуют реализации лечебного действия других препаратов (антибиотики, пробиотики) и не чувствительны к их воздействию.

В последние годы значительно возросло количество кишечных и гнойно-септических заболеваний, вызванных условно-патогенными возбудителями, в частности бактериями рода *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, относящихся к разряду внутригоспитальных. Эти бактерии являются причиной хирургических и кишечных инфекций, урогенитальной патологии, гнойно-септических и кишечных заболеваний. Летальность при этих инфекциях достигает 30–60%. Вместе с тем лечение данных заболеваний затруднено высокой частотой (50–95%) антибиотикорезистентности и резистентности возбудителей к химиотерапевтическим препаратам, проявлением токсических и многочисленных аллергических реакций, тератогенным действием на плод в процессе беременности, а также осложнениями в виде явлений дисбактериоза при воздействии на организм антибиотических средств [14, 15, 16]. В то же время многолетняя клиническая практика применения препаратов бактериофагов при указанных инфекционных заболеваниях свидетельствует об их эффективности в 77–93% случаев. К примеру, использование поливалентного пубактериофага «Секстафаг» при лечении инфицированного панкреонекроза (Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера) позволило быстрее восстанавливать у больных основные параметры гомеостаза и функции органов и систем. Также значительно снижалось количество послеоперационных осложнений и летальных исходов: в группе больных, получавших стандартную терапию, летальность составила 100%, в то время как в группе, получавшей бактериофаг, — 16,6% [17]. Показательны в своей эффективности результаты сочетания фаготерапии и антибиотикотерапии при ассоциированных инфекциях, вызванных полирезистентными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* (MRSA) [18], а также опыт одновременного применения фагов, озонированных растворов и сорбционных повязок в терапии гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей [19], что позволило почти вдвое по сравнению с традиционной терапией сократить сроки лечения.

Лечебно-профилактические бактериофаги

№ п/п	Наименование препарата	Спектр антибактериальной активности	Область применения
1	Бактериофаг дизентерийный	<i>Shigella sonnae, flexneri</i> 1,2,3,4,6 serotypes	Лечение больных дизентерией и профилактика данного заболевания. Санация реконвалесцентов.
2	Бактериофаг сальмонеллезный ABCDE	<i>Salmonella Serogroup A (S. paratyphi A); Serogroup B (S. paratyphi B., S. typhimurium, S. Heidelberg,); Serogroup C (S. choleraesuis, S. Newport, S. oranienburg, S. infants); Serogroup D (S. enteritidis, S. dublin, S. pullorum); Serogroup E (S. newlands, S. anatum)</i>	Лечение и профилактика сальмонеллезов.
3	Бактериофаг брюшнотифозный	<i>Salmonella typhi</i>	Профилактика брюшного тифа.
4	Бактериофаг стафилококковый	<i>Staphylococcus aureus</i> и ряд других видов коагулазоотрицательных стафилококков	Лечение и профилактика гнойных инфекций кожи, слизистых, вызванных стафилококками, а также при дисбактериозах. Применяется для лечения циститов, холециститов, острых тонзиллитов, энтероколитов и др.
5	Бактериофаг стрептококковый	<i>Streptococcus, Enterococcus</i>	Лечение и профилактика гнойно-воспалительных и энтеральных заболеваний, а также дисбактериозов. С профилактической целью применяется для обработки послеоперационных и свежее инфицированных ран.
6	Бактериофаг протейный	<i>Proteus vulgaris, mirabilis</i>	Лечение и профилактика гнойных инфекций, вызванных протейными бактериями, а также при дисбактериозах. Применяется для лечения абсцессов, гнойно-осложненных ран, циститов и др.
7	Бактериофаг коли	Энтеропатогенная <i>Escherichia coli</i>	Лечение и профилактика инфекций кожи и внутренних органов: гнойно-осложненные раны, ожоги, абсцессы, плевриты. Применяется для лечения циститов, энтероколитов, токсикоинфекций, а также для профилактики колиинфекций при свежее инфицированных ранах, травмах, ожогах.
8	Бактериофаг синегнойный	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Лечение заболеваний различных органов и гнойных инфекций кожи. Применяется для лечения абсцессов, хирургических инфекций, гнойно-осложненных ран, циститов и др.
9	Бактериофаг клебсиел пневмонии очищенный	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Лечение хирургических инфекций, заболеваний урогенитальной сферы и желудочно-кишечного тракта, гнойно-воспалительных заболеваний уха, горла и носа, а также при сепсисе новорожденных и детей грудного возраста. Применяется также для селективной деконтаминации кишечника.
10	Бактериофаг клебсиел поливалентный очищенный	<i>Klebsiella rhinoscleromatis, pneumoniae, ozaenae</i>	Лечение озы, риносклеромы и гнойно-воспалительных заболеваний. Применяется для лечения отитов, воспалений пазух носа и для других гнойно-воспалительных заболеваний уха, горла и носа.

№ п/п	Наименование препарата	Спектр антибактериальной активности	Область применения
11	Бактериофаг коли-протейный	Энтеропатогенная <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>mirabilis</i>	Лечение и профилактика энтероколитов и лечение кольпитов колипротейной этиологии.
12	Пиобактериофаг поливалентный	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , энтеропатогенная <i>Escherichiae coli</i>	Лечение и профилактика различных форм гнойно-воспалительных и энтеральных заболеваний. Применяется для лечения хирургических инфекций, ожогов, гнойных поражений кожи, циститов и пиелонефритов, гастроэнтероколитов, холециститов, дисбактериоза кишечника, а также энтеритов и дисбактериоза кишечника новорожденных и детей грудного возраста.
13	Пиобактериофаг комплексный	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , энтеропатогенная <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>	
14	Интести-бактериофаг	<i>Shigella sonnae</i> , <i>flexneri</i> 1,2,3,4,6, <i>Salmonella</i> ABCDE, энтеропатогенная <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>mirabilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus</i>	Лечение острых и хронических заболеваний: дизентерии, сальмонеллеза, диспепсии, колита, энтероколита.

Вследствие безвредности и ареактогенности препаратов бактериофагов возможно их применение в педиатрической практике, в том числе и у новорожденных детей. Интересен опыт Нижегородской детской областной клинической больницы (отделение реанимации новорожденных), где в период осложнения эпидемиологической ситуации наряду с обычными противоэпидемическими мероприятиями были использованы и бактериофаги. Фагирование внешней среды всех функциональных помещений отделения проводилось «Интести-бактериофагом» и бактериофагом *Pseudomonas aeruginosa*. В профилактических целях синегнойный бактериофаг применяли всем новорожденным через рот при поступлении в отделение, а также фагировали новорожденных, контактных по палате с больным синегнойной инфекцией. Этот препарат применяли в увлажнительных камерах аппаратов искусственной вентиляции и путем распыления во внешней среде палаты, в которой находился больной. Снижение заболеваемости внутрибольничной инфекцией синегнойной этиологии в 11 раз, а также уменьшение в стационаре контаминированности объектов внешней среды продемонстрировали высокую эффективность применения бактериофагов [20].

Была показана целесообразность применения препаратов бактериофагов для ликвидации инфицирования дренажных трубок в раннем послеоперационном периоде у детей с острым пиелонефритом: клиническая эффективность использования колипротейного бактериофага составила 75%, а клебсиеллезного — 100% [21].

Препараты бактериофагов могут назначаться как для лечения дисбактериоза и расстройств пищеварительной системы, так и для предотвращения колонизации слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта условно-патогенными бактериями. Поликомпонентные препараты бактериофагов идеально подходят для немедленного реагирования на первые признаки расстройства желудочно-кишечного тракта, поскольку включают в себя фаги ко всем видам бактерий, вызывающим отравления.

На сегодняшний день на предприятии ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ намечен целый ряд приоритетных направлений разработки и производства лечебно-профилактических бактериофагов, которые коррелируют с вновь зарождающимися общемировыми тенденциями. Создаются и внедряются новые препараты: разработаны бактериофаги против сerratий и энтеробактерий, ведутся работы по созданию фагового препарата против *Helicobacter pylori*.

Поскольку при приеме жидких препаратов через рот происходит частичная инактивация бактериофагов кислой средой желудка, целесообразно выпускать уже производимые препараты бактериофагов в таблетках и суппозиториях. К примеру, неоднократное изучение применения бактериофагов в форме ректальных суппозиториях в клинической практике показало, что ректальный способ введения препарата обладает рядом преимуществ перед пероральным:

- фаги не инактивируются соляной кислотой желудочного сока;

- обеспечивает более длительную циркуляцию фагов в организме человека;

- обеспечивает насыщение венозной системы кишечника с дальнейшим поступлением препаратов бактериофагов в общий кровоток;

- оказывает специфическое действие на энтеробактерии толстой кишки.

Ведутся разработки принципиально новых препаратов на основе бактериофагов и полимеров. Активные полимеры сами по себе применяются в терапии различных заболеваний, а в сочетании с препаратами бактериофагов представляется возможным значительно расширить область применения подобных комбинированных препаратов и повысить эффективность терапевтического воздействия. Планируется выпуск препаратов в виде мазей, гелей, линиментов и активных пленок с бактериофагами.

Представляются перспективными работы в направлении конструирования препаратов на основе продуктов жизнедеятельности бактериофагов. Фаги синтезируют обязательные для разрушения клеточной стенки бактерий продукты — комплекс литических ферментов — эндолизины.

Эндолизины обладают действием антибиотиков, разрушая бактерии при прямом контакте, и их применение приводит к почти мгновенному лизису. Запланирован ряд совместных разработок со специалистами в области фаговых эндолизинов по выделению, синтезу современными методами генной инженерии и производству препаратов эндолизинов.

Резюмируя, следует еще раз подчеркнуть основной ряд преимуществ бактериофагов перед антибиотиками, которые позволяют охарактеризовать фаготерапию как одно из перспективных направлений для практического здравоохранения:

- бактериофаги высокоспецифичны при лечении инфекций, не подавляют нормальную микрофлору и не нарушают естественный баланс внутренней среды организма, то есть фаготерапия является этиотропной, специфической;

- бактериофаги не имеют противопоказаний к применению: их можно назначать беременным, кормящим матерям и детям любого возраста, включая недоношенных;

- бактериофаги не вызывают развития резистентности микроорганизмов;

- бактериофаги оказывают стимулирующее влияние на гуморальное и клеточное звенья иммунитета;

- бактериофаги не обладают токсическим, аллергическим и тератогенным эффектами;

- бактериофаги эффективны в монотерапии, но также могут применяться в комбинации с другими препаратами, в том числе с антибиотиками и пробиотиками.

Литература

1. *Veiga-Crespo P., Barros-Velázquez J. et al.* What can bacteriophages do for us? / In: *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Ed. A. Mendez-Vilas. Formatex. Spain, 2007. — Vol. 2. — P. 885–893.
2. *Antimicrobial resistance: issues and options / Workshop report.* — Washington D.C.: National Academy Press, 1998. — 128 p.
3. U.S. Food and Drug Administration [Electronic resource]. — Mode access: <http://www.fda.gov>. (03.09.2009 г.)
4. Intralytix Inc. [Electronic resource]. — Mode access: <http://www.intralytix.com>. (03.09.2009 г.)
5. Novolytics Limited [Electronic resource]. — Mode access: <http://www.novolytics.co.uk>. (03.09.2009 г.)
6. Angel Biotechnology [Electronic resource]. — Mode access: <http://www.angelbio.com>. (03.09.2009 г.)
7. Biocontrol Limited [Electronic resource]. — Mode access: <http://www.biocontrol-ltd.com>. (03.09.2009 г.)
8. *Wright A., Hawkins C.H. et al.* A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy // *Clinical Otolaryngology*. — 2009. — Vol. 34. — Issue 4. — P. 349–357.
9. *Захарова Ю.А.* Использование бактериофагов у беременных с пиелонефритом: дисс. ... канд. мед. наук. — Пермь, 2004. — 133 с.
10. *Кисина В.И., Перепанова Т.С., Забиров К.И. и др.* Фаготерапия воспалительных урогенитальных заболеваний у женщин // *Вестник дерматологии и венерологии*. — 1996. — № 5. — С. 45–48.
11. *Падруль М.М., Захарова Ю.А., Николаева А.М. и др.* Микробиологическая диагностика инфекций мочевых путей у женщин при беременности и использование препаратов бактериофагов при данной патологии. Методические рекомендации. — Пермь, 2007. — 29 с.
12. *Падруль М.М., Макарова Е.Л., Терезина Н.А.* Изучение влияния секстафага на показатели обмена меди при лечении беременных с пиелонефритом / В сб.: *Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов: Материалы Всероссийской научно-практической конф. 18–19 июня 2008 г.* — Пермь, 2008. — С. 102–104.
13. *Алсынбаев М.М., Медведев Ю.А., Туйгунов М.М.* Биопрепараты и ведущие направления их лечебно-профилактического применения: монография. — Уфа: РИО филиала «Иммунопрепарат» ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ, 2008. — 100 с.
14. *Бактериофаги — антибактериальные препараты будущего: Сб. статей.* — М., 2009. — 66 с.

15. Карбелеш Е.Е., Ткаченко С.А., Панкратов С.М., Демедюк О.И. Применение бактериофагов как концепция лечебного и профилактического направления в медицине // Актуальные проблемы транспортной медицины. — 2008. — № 1(11). — С. 135–139.
16. Ворошилова Н.Н., Боговазова Г.Г., Казакова Т.Б., Перепанова Т.С., Дарбеева О.С. Изучение клинической эффективности препаратов бактериофагов при лечении энтеральных и гнойно-воспалительных заболеваний / В сб.: Актуальные вопросы разработки и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов: Материалы Всероссийской конф. — Уфа, 2000. — С. 87–94.
17. Грищук В.В., Заривчацкий М.Ф. Применение поливалентного бактериофага «Секстафаг» в комплексном лечении инфицированного панкреонекроза / В сб.: Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов: Материалы Всероссийской научно-практической конф. 18–19 июня 2008 г. — Пермь, 2008. — С. 100–102.
18. Захарова Ю.А., Белокрылов Н.М. Клинический случай лечения пациента с остеомиелитом, вызванным полирезистентными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* с использованием метода фаготерапии / В сб.: Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов: Материалы Всероссийской научно-практической конф. 18–19 июня 2008 г. — Пермь, 2008. — С. 96–97.
19. Заривчацкий М.Ф., Мутагаров И.Н., Швецова Ю.А. Использование препаратов бактериофагов для лечения гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей / В сб.: Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов: Материалы Всероссийской научно-практической конф. 18–19 июня 2008 г. — Пермь, 2008. — С. 104–106.
20. Аникина Т.А., Рязанова С.Х., Сергеева Е.Н. и др. Свежевыделенные штаммы возбудителей - важнейший компонент производства адаптированных лечебно-профилактических бактериофагов / Предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио», Вакцинология. — Нижний Новгород, 2006. — С. 3.
21. Алгоритм диагностики и лечения инфекции мочевой системы у детей: метод. рекомендации (№ 41) / Сост. Т.Б. Сенцова, Т.В. Сергеева, С.П. Яцык и др. Научный Центр здоровья детей РАМН. — Москва, 2003. — 21 с.

A BRIEF REVIEW OF CURRENT STATUS AND FUTURE DIRECTIONS OF DEVELOPMENT OF PRODUCTION AND USE OF THERAPEUTIC AND PROPHYLACTIC DRUGS BACTERIOPHAGES

I.V. KRASILNIKOV, A.K. LOBASTOVA, K.A. LYSKO

Federal State Unitary Enterprise «NPO «Microgen» Public Health Ministry RF, Moscow

The review deals with the problem of clinical application of phages in modern medicine. Emphasis is placed on the potential of domestic scientific and practical institutions, mainly FSUE «NPO «Microgen» Public Health Ministry.

Keywords: bacteriophages, production, the clinical application.

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ МЕТОДОЛОГИИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Н.Г. ПЛЕХОВА^{*}, Л.М. СОМОВА¹, К.А. ДРЕККО²

¹ Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии Сибирского отделения РАМН;

² Тихоокеанский государственный экономический университет, Владивосток

В обзоре проведен анализ современных методов определения эффективности безопасности биологически активных соединений (БАС), начиная с традиционных, общепринятых подходов и заканчивая новейшими высокотехнологическими способами оценки БАС.

Ключевые слова: биологически активные соединения, биохимия, методы, биосовместимость.

Важнейшей социально значимой областью применения изобретений в приоритетном направлении критических технологий — биотехнологии и геной инженерии — является область медицины, в которой проводятся разработки технологий изготовления новых фармакологических и иммунобиологических препаратов, а также различных материалов для медицинского инструментария, оборудования и протезирования [1]. Перспективы развития технологии производства лекарственных препаратов определяются требованиями современной фармакотерапии, которые предусматривают создание максимально эффективных с лечебной точки зрения препаратов при содержании в них минимума субстанций, обладающих побочными действиями. На роль таких средств идеально подходят биологически активные соединения (БАС), имеющие подтвержденную клиническую эффективность. В то же время довольно частым явлением в России стала негативная потребительская оценка многих БАС, полезность которых отмечена в большинстве развитых государств (США, Япония, Франция, Германия и т.д.). Такая реакция обусловлена, главным образом, не сомнением в безопасности этих продуктов, а неоправдавшимися надеждами потребителей на их эффективность [2]. Это исходит из

того, что зачастую состав действующего начала, соотношение компонентов и механизмы физиологического действия БАС слабо изучены и практически не известны разработчикам и производителям. Так происходит при отсутствии специфичности воздействия известных БАС, когда они вызывают многообразные фармакологические эффекты, часть из которых используется для лечения определенной патологии, а остальная может быть причиной побочного действия и токсичности. При наличии достаточно богатой коллекции разнообразных БАС Россия обладает ограниченными возможностями для их экспериментального тестирования, что требует тщательнейшего отбора потенциально перспективных веществ уже на ранних стадиях исследования [3]. Особенно это касается БАС — парафармацевтиков на основе натурального сырья, а именно: лекарственных растений, материалов растительного и животного происхождения, которые имеют в своем составе биологически активные вещества, стандартизация которых затруднена или невозможна. Обеспечить безопасность биологически активных добавок при их обороте на рынке невозможно без надежных методов контроля содержания в них активно действующих веществ и подтверждения подлинности заявляемых в составе продукции компонентов [4].

Нельзя не отметить особое внимание в мире к перспективам развития нанотехнологий, то есть технологий направленного получения и использования веществ и материалов в диапазоне размеров до 100 нм. Эти материалы могут найти и уже находят применение в научных исследованиях и медицинской отрасли. Так, созданы сенсоры на основе наноматериалов — наносенсоры, к которым относятся наночастицы, нанокластеры, используемые

©2010 г. Плехова Н.Г., Сомова Л.М., Дрекко К.А.

*** Автор для переписки:**

Плехова Наталья Геннадьевна, д.б.н.,

зав. лабораторией патоморфологии

и электронной микроскопии НИИ ЭМ СО РАМН

690087, Владивосток, ул. Сельская, 1

Тел.: 4232 442 434; факс 4232 441 147

E-mail: pl_nat@hotmail.com

в биохимических сенсорах, нанотрубки, применяемые в оптических (биохимических) пьезосенсорах, и сенсоры на основе наноразмерных организованных пленочных структур [5]. Развитие технологии изготовления наносенсоров в будущем позволит решить многие вопросы диагностики и мониторинга функционирования живых организмов при воздействии на них окружающей среды. Уникальные свойства наноматериалов и их биологическая активность могут быть использованы, в частности, для адресной доставки лекарственных препаратов, для борьбы с онкологическими заболеваниями и инфекциями и во многих других областях [6]. Учитывая, что в перспективе ожидается тесный контакт человека с наноматериалами, изучение потенциальных рисков их использования представляется первостепенной задачей. За рубежом проблема безопасности наноматериалов для человека выдвигается на первый план [7].

Особые свойства наноматериалов обусловлены их небольшими размерами и разнообразными формами. Эти свойства позволяют наночастицам связываться с нуклеиновыми кислотами (вызывая, в частности, образование аддуктов ДНК), белками, встраиваться в мембраны, проникать в клеточные органоиды и тем самым изменять функции биоструктур [8]. Из-за малого размера наночастицы не распознаются защитными системами организма, не подвергаются биотрансформации и не выводятся из организма; им присуща высокая адсорбционная активность и по этой причине возникает возможность транспорта контаминантов внутрь клетки, что резко увеличивает их токсичность. Совокупность изложенных факторов свидетельствует о том, что наноматериалы могут обладать совершенно иными физико-химическими свойствами и биологическим (в том числе токсическим) действием, чем вещества в обычном физико-химическом состоянии. Таким образом, наноматериалы относятся к тем новым видам продукции, характеристика потенциального риска которых для здоровья человека и состояния среды обитания является обязательной.

Существующая в настоящее время методология оценки риска применения наноматериалов основывается на полной токсикологической оценке конкретного вещества или соединения и определении дозозависимости, и многие известные методы изучения биосовместимости инородных материалов с организмом в данном случае необходимо адаптировать [9]. В настоящее время в мире разрабатываются методы определения свойств наноматериалов, основанные на использовании масс-спектрометрии матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ), электрических и

белковых биосенсоров и многих других [10], но при этом отсутствуют или недоступны новые базы данных и математические модели, опирающиеся на достижения биоинформатики и экспериментальные данные по токсичности отдельных наноматериалов [9].

Основные задачи исследования новых БАС заключаются в следующем: идентифицировать и охарактеризовать сырье; установить биодоступность и биологическую активность; идентифицировать активный компонент(ы) и исследовать механизм(ы) действия, затем осуществить клиническую оценку по фазам I и II [4]. Последние испытания позволяют оценить такие свойства БАС, как длительность баланса безопасности/эффективности лекарственных форм активного ингредиента; общую и относительную терапевтическую ценность; специфическую характеристику препарата, а также профиль и разновидность наиболее часто встречающихся побочных реакций [11].

Полный набор фармакологических эффектов, которые может проявить БАС в различных условиях эксперимента, называется спектром биологической активности данного вещества. В процессе исследования нового БАС характеристики его биологической активности могут проявляться по-разному. Так, некоторые эффекты обнаруживаются уже при первом тестировании на моделях «in vitro», другие — при изучении его действия на экспериментальных животных, третьи — при проведении клинических испытаний и последующем использовании препаратов в медицинской практике. Причем, это действие веществ может проявляться в организме в течение многих лет.

Методы определения показателей безопасности БАС подразделяют на объективные и субъективные. К объективным относят физико-химические, микробиологические и токсикологические методы. Комплекс физико-химических показателей действия БАС включает в себя определение pH, содержания щелочи, токсичных элементов и др. Все виды БАС проверяют на микробиологическую загрязненность и эффективность. Токсикологическую оценку действия БАС проводят на животных, при этом определяют острую и хроническую токсичность, кожно-резорбтивное, раздражающее и сенсибилизирующее (аллергизирующее) действия, как отдельных ингредиентов, так и готовых форм БАС [4].

Под биотестированием (англ. «bioassay») понимают процедуру установления токсичности среды с помощью тест-объектов, сигнализирующих об опасности. Благодаря простоте, оперативности и доступности биотестирование получило широкое признание во всем

мире и его все чаще используют наряду с методами аналитической химии. Биотестирование действия БАС подразделяется на морфофизиологическое и хемотаксическое. Хемотаксический метод более точный, так как в нем используются специальные приборы, а морфофизиологический позволяет описать, что происходит с тест-объектами. Так, на основе параметров жизнедеятельности тест-объекта, а именно: его роста, размножения и функционирования можно судить о степени эффективности БАС. При изменении состава окружающей среды тест-объекта, например, при введении дополнительного (определяемого) соединения, организм (называемый индикаторным) мгновенно или через определенное время подает соответствующий ответный сигнал. Аналитическими индикаторами при биотестировании БАС являются различные живые организмы, их органы и ткани, физиологические функции, биохимические реакции и т.д.

Условно все вещества по отношению к живым организмам можно разделить на: 1) жизненно необходимые, 2) токсичные, 3) физиологически неактивные. Если в двух первых случаях можно ожидать сравнительно быструю ответную реакцию организма (аналитический сигнал), то физиологически неактивные вещества могут дать отдаленный результат или вследствие реакций взаимодействия с ингибиторами либо стимуляторами процессов жизнедеятельности организма их можно перевести в активное состояние [12].

От цели исследования свойств БАС зависит выбор индикаторного организма и способа регистрации его ответного сигнала. Ответный сигнал тест-объекта на изменение химического состава окружающей среды индикаторного организма может выражаться в его поведенческой реакции, в изменении параметров роста, размножения, пигментации, состава крови, биоэлектрической активности органов и тканей. Чем сложнее организм, тем большее количество аналитических индикаторов его жизненных функций можно использовать и тем выше информативность биологических методов анализа. Ответный сигнал индикаторного организма на одно и то же вещество зависит от концентрации последнего: малые концентрации обычно стимулируют процессы жизнедеятельности организма, высокие — угнетают. Предел обнаружения соединений также зависит от физико-химических и биологических факторов: направленности и продолжительности воздействия БАС на организм; температуры и рН среды; уровня организации индикаторного организма, его индивидуальных, возрастных, половых особенностей. В роли индикаторного организма

могут выступать микроорганизмы, беспозвоночные, позвоночные.

Методы определения степени воздействия БАС на микроорганизмы предполагают культивирование чистых индикаторных культур на плотных или жидких питательных средах при постоянных условиях (температуре, рН, воздухообмене, влажности), с учетом фаз их роста. Наиболее часто в качестве индикаторных организмов используют бактерии (рода *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Staphylococcus*), актиномицеты, плесневые грибы, дрожжи, водоросли. Эти микроорганизмы обладают высокой чувствительностью к действию БАС, просты в культивировании и хранении, длительное время сохраняют свои свойства в виде лиофилизированных препаратов. На плотных питательных средах регистрируют изменения внешнего вида колоний, их размеров и формы, характерной для каждого вида микроорганизмов. В этом случае методы определения воздействия БАС основаны на диффузии этих веществ в агаризованную среду с образованием зон угнетения или стимуляции роста. В жидких питательных средах характер роста бактериальных культур зависит от количества определяемого компонента, в результате чего изменяется помутнение культурального раствора по сравнению с контрольным. По данным фотометрических измерений строят градуировочный график зависимости интенсивности изменения оптической плотности исследуемого раствора от концентрации определяемого вещества [13].

Наиболее активно в качестве тест-объекта используют микроорганизмы для выявления бактерицидной активности веществ. Учитывая способность микроорганизмов в процессе жизнедеятельности селективно накапливать микроэлементы из разбавленных растворов, возможно их использование для различных видов химического анализа растворов. Например, плесневые грибы применяют для избирательного осаждения золота из хлоридных растворов, очистки растворов от ионов меди, цинка, железа [14].

Чрезвычайно высокой чувствительностью определения эффективности некоторых БАС отличается биолюминесцентный метод, основанный на реакции окисления кислородом воздуха субстрата — люциферина, катализируемой ферментами люциферазами, выделенными из различных видов морских светящихся бактерий *Photobacterium*, *Veneckeia* или жуков-светляков [15]. Наряду с люциферинном и люциферазой для протекания указанной реакции необходима АТФ, которая участвует в многочисленных метаболических реакциях в организме. При угнетающем или стимулирующем действии каких-

либо веществ на рост микроорганизмов содержание АТФ в них соответственно понижается или повышается. Специфичность действия люциферазы насекомых по отношению к АТФ, высокий квантовый выход реакции позволили создать на этой основе высокочувствительные и селективные методы определения АТФ, а также различных метаболитов, в процессе превращения которых образуется АТФ [15].

Наиболее изученными с точки зрения использования простейших для анализа эффективности БАС являются инфузории *Paramecium caudatum* и водные беспозвоночные — ракообразные (чаще всего ветвистосусые рачки, дафнии), скорость движения и размножения которых изменяется при введении в среду их обитания различных веществ. В качестве аналитического сигнала используют физиологические показатели: выживаемость, поведенческие реакции, частоту движения ножек, период сокращения сердца (у дафний), фиксируемые с помощью специальной аппаратуры, и окраску тел погибших организмов.

Недавно исследователями для определения местоположения в живых образцах ионов металлов, входящих в состав БАС, а именно: дафниях, было использовано рентгеновское излучение [16]. Новый метод является комбинацией синхротронной рентгеновской флуоресценции и рентгеновской микротомографии, что позволяет изучать живой тест-объект в трех измерениях, не разрушая его, чего нельзя достичь, используя традиционные аналитические методы. Такая комбинация дает возможность построить 2D- и 3D-образы распределения металлов с точностью до микро- или нанометров, используя в качестве объекта изучения непосредственно живой организм.

Классическими индикаторными организмами для изучения свойств БАС из позвоночных являются амфибии. На изолированных органах и тканях лягушки *Rana ridibunda* либо на всем организме проверяется физиологическая активность многих фармацевтических препаратов, когда в качестве индикатора для определения концентрации используется биопотенциал ее нервной ткани. Также в биологических методах анализа эффективности БАС возможно использование вазомоторных реакций организма, их влияние на тонус и метаболизм сосудов, мембрану гладкомышечных тканей, специфические клеточные рецепторы сосудов и т.д. Так, на изолированных нервно-мышечных препаратах лягушек *Rana ridibunda* и *Rana temporaria* или беспозвоночного животного — виноградной улитки — выявляют внутриклеточные механизмы воздействия БАС на функционирование нервно-мышечного синапса. Это позволяет

оценить степень воздействия испытуемых веществ на нервные окончания тест-объектов [17].

К биологическим методам анализа свойств БАС относят биохимические методы, в частности ферментативные, например, индикаторные трубки на основе ферментов и других биологических материалов. Известно, что механизм получения информации о составе какого-либо объекта с помощью этих методов и устройств моделирует процесс в живой системе [18]. Достижения в этой области биохимии позволили реализовать возможность использования каталитических свойств ферментов вне их связи с живым организмом при сохранении указанных свойств в течение длительного времени. Это явилось началом развития безреагентных методов анализа, основанных на использовании различных биохимических сенсоров. Под термином «биосенсор» понимают устройство, в котором чувствительный слой содержит биологический материал или наноматериал: ферменты, ткани, бактерии, дрожжи, антигены/антитела, липосомы, органоиды, рецепторы, ДНК. Этот слой реагирует на присутствие определяемого компонента БАС, генерирует сигнал, функционально связанный с концентрацией и силой воздействия этого компонента [19]. Наличие в биосенсорах слоя с уникальными свойствами позволяет с высокой селективностью определять нужные соединения в сложной по составу смеси, без выделения активного начала БАС. Функционально биосенсоры сопоставляются с датчиками живого организма — рецепторами клеток, способными преобразовывать все типы сигналов, поступающих из окружающей среды, в электрические. Например, из органов голубого краба был извлечен хеморецептор и прикреплен к ультрамикрорезистору, измеряющему потенциал, что позволило осуществлять регистрацию ничтожных изменений состава окружающей среды [20].

Таким образом, биологические методы анализа, основанные на использовании в качестве аналитического сигнала специфических отклонений индикаторных организмов от нормы, дают возможность с достаточно высокой чувствительностью определять широкий круг неорганических и органических физиологически активных соединений в различных объектах. По чувствительности они превосходят химические методы, сопоставимы, как правило, с традиционными физическими методами анализа, уступая таким современным спектроскопическим методам, как атомная абсорбция с термической атомизацией, атомная эмиссия с возбуждением в высокочастотной плазме, а также методу инверсионной вольтамперометрии и некоторым другим.

Определение присутствия и концентрации БАС в различных жидкостях может проводиться с помощью различных приборов: хроматографических и масс-спектрометрических анализаторов, спектрофотометрических анализаторов и тому подобных. Одним из методов, позволяющих моделировать биохроматографические процессы, происходящие при введении лекарственных препаратов в живой организм, является хроматография. Многими авторами сорбция БАС рассматривается как один из возможных механизмов его биологического действия, поэтому исследование взаимосвязи физико-химических и хроматографических характеристик с вероятностью проявления биологической активности представляется весьма перспективным [20]. Также исследование величин удерживания в газо-жидкостном варианте может оказаться полезным при моделировании механизма биологического действия лекарственных препаратов и БАС [21].

Антиоксидантная активность БАС определяется с помощью амперометрического метода [22]. В основу этого метода положено измерение силы электрического тока, возникающего при окислении молекул антиоксиданта (БАС) на поверхности рабочего стеклоуглеродного электрода при определенном потенциале, выраженном в цифровом сигнале. Измеряется аномальная оптическая активность, генерируемая в результате взаимодействия БАС с двухцепочечными молекулами ДНК со специально подобранными полусинтетическими соединениями, образующими жидкокристаллическую дисперсию. Наличие разных по своей химической природе составных частей комплекса («строительных блоков»), а именно: молекул ДНК и хитозана, свойства которых могут меняться при действии на них БАС, в сочетании с сохранением легко детектируемой аномальной оптической активности открывает возможность применения жидкокристаллической дисперсии в качестве интегрального биодатчика. Оптические свойства такого биодатчика меняются при действии различных БАС, нарушающих как структуру молекул ДНК, так и хитозана [23].

Как уже упоминалось выше, исследователями при изучении свойств новых и уже известных БАС широко используется модель «in vitro», когда биотестирование проводится на культурах клеток. В последние годы на основе оптических микроскопов была усовершенствована система наблюдения за живыми объектами. Так, конфокальная система фильтрации сигнала позволяет избирательно наблюдать флуоресцирующие молекулы в неокрашенных и слабоконтрастных биологических объектах, таких как живые клетки. Появились новые методы

лазерной флуоресцентной микроскопии биологических образцов: лазерная сканирующая конфокальная микроскопия (ЛСКМ), микроспектроскопия, многофотонная микроскопия [25], микроскопия на основе измерения времени существования флуоресценции [26], микроскопия с применением эффекта полного внутреннего отражения и 4Pi микроскопия [27]. Это обеспечило измерение флуоресцентных сигналов с трехмерным субмикронным разрешением и существенно расширило возможности неразрушающего анализа прозрачных образцов.

Наиболее часто встречающейся задачей для конфокальной микроскопии является изучение структуры клеток и их органоидов благодаря их высокому разрешению и контрасту, например, цитоскелета, ядра, хромосом, или даже локализации в них отдельных генов. Исследуется также солокализация в клетке двух и более веществ, например, белков, что представляет особый интерес для изучения проникновения БАС в клетки. Количество БАС, которое вводится в организм человека или животного, жестко ограничено нетоксичными дозами, и концентрация БАС в исследуемых тканях, как правило, невелика. Спектральная ЛСКМ позволяет достоверно разделить эндогенные сигналы и флуоресценцию БАС, интенсивность которого мала, и провести анализ распределения исследуемого БАС в различных тканевых структурах [28]. Реконструированные карты распределения по клетке БАС и их компонентов (спектральные изображения) описывают накопление, микроокружение и взаимодействие изучаемого соединения в различных клеточных доменах и структурах. Такая методика исследования создает основу для измерения концентрации БАС и их комплексов в живых клетках. Эта задача весьма актуальна при анализе малых внутриклеточных концентраций флуоресцирующих БАС и слабо флуоресцирующих молекул, а также при изучении взаимодействий лиганд-рецептор и антиген-антитело, когда количество рецепторов и антигенов на мембране клеток мало. С использованием микроспектрофлуориметрии продемонстрирована перспективность ее применения для изучения ксенобиотиков (БАС), используемых (разрабатываемых) в медицинских целях и обладающих антипсориазной [29], фотодинамической [30], противоопухолевой (цитостатической) [31] активностью.

Новыми перспективными направлениями оптических методов являются методики FRAP — Fluorescence Recovery After Photobleaching (Восстановление флуоресценции после фотовыжигания) и FRET — Fluorescence Resonance Energy Transfer (Передача энергии посредством флуоресцентного резонанса). FRAP применяется

для исследования подвижности биоорганических молекул посредством инициации фотохимического разложения флуорохрома в зоне облучения и последующего его расщепления с молекулами. После выжигания молекулы с флуорохромом из необлученной зоны движутся вследствие диффузии в облученную зону образца. По времени нарастания в ней флуоресценции можно судить о подвижности молекул. Так, в исследованиях свойств БАС, производных фталоцианина, хлорина и бактериохлорина [32] сформировался обобщенный подход к изучению взаимосвязей между структурой фотосенсибилизаторов и их ключевыми свойствами, определяющими фотодинамический эффект в растворах, клетках и живых организмах.

FRET применяется для определения расстояния между молекулами, их окружения и взаимодействия. Молекулы метятся двумя флуорохромами со спектром испускания донора, перекрывающимся со спектром поглощения акцептора. Энергия от донора к акцептору передается на малые расстояния (несколько нм) в результате резонанса между энергетическими уровнями, а его вероятность зависит от расстояния между молекулами. Затем акцептор излучает энергию в видимой области спектра, которая регистрируется при конфокальной микроскопии.

Таким образом, количественные методики спектральной ЛСКМ успешно применяются для исследования концентрационных и временных зависимостей клеточного накопления, распределения и выведения флуоресцентно меченных БАС [33] и различных фотосенсибилизаторов [34]. С помощью этих методов возможно изучение способности БАС к агрегации/диссоциации в водных растворах и влияния этого процесса на их проникновение в клетки; исследование генерации клетками активных форм кислорода и образования внутриклеточных молекулярных комплексов и метаболитов под воздействием БАС; изучение внутриклеточного распределения и избирательности накопления БАС в определенных клеточных органоидах; исследование кинетических характеристик клеточного накопления и удержания БАС и т.д.

Одна из важнейших и сложнейших задач при проведении микроопераций с биообъектами — это выделение интересующего элемента (например, живой клетки, хромосомы, макромолекулы определенного вида) из имеющегося биологического материала без его загрязнения и повреждения. Технология лазерной системы микродиссекции позволяет изолировать высокоочищенные клеточные популяции из гетерогенных срезов ткани, цитологических препаратов или живых клеточных культур при прямой визуализации этих объектов и при

этом избежать возможных повреждений или изменений клеток либо минимизировать их. Сфокусированный лазерный луч длительностью всего в 3 наносекунды не только вырезает нужный микрообъект, не повреждая его, но и катапультирует в улавливающий микроконтейнер, отделяя его от остального материала. Этим же лазерным лучом можно предварительно разрушить в исследуемом образце те элементы, которые могут мешать выделению (иссечению и катапультированию) нужного объекта. Как уже упоминалось выше, особые свойства наночастиц, способных связываться с нуклеиновыми кислотами, белками, встраиваться в мембраны, проникать в клеточные органоиды, изменяя тем самым функции биоструктур, резко увеличивают их токсичные свойства. Технология лазерной системы микродиссекции позволяет подвести молекулярную основу для оценки взаимодействия наночастиц с клетками и тканями организма [35].

К заключительному этапу исследования эффективности БАС относят клинические испытания — системное изучение их свойств посредством применения его человеком (пациентом или здоровым добровольцем). В конечном итоге это позволяет оценить безопасность и эффективность БАС, выявить сроки его распределения и метаболизма в организме и возможность взаимодействия с другими лекарственными средствами. Современные подходы к проведению клинических исследований БАС различных фармакотерапевтических групп указаны в «Руководстве по проведению клинических исследований новых лекарственных средств» [36], где изложены общие и частные вопросы проведения клинических исследований, представлены обязательные и желательные критерии оценки эффективности изучаемых препаратов, а также подробно рассмотрены стандартно оцениваемые параметры безопасности лечения, включающие и нежелательные явления. Согласно международному соглашению GCP («Good Clinical Practice» — надлежащая клиническая практика), в первую очередь разрабатывается протокол клинических испытаний, где четко определяются фазы, дизайн испытаний, количество испытуемых, характер патологии [37]. После подготовки протокол одобряется и по специальным формам комитета по этике составляется согласие добровольцев на испытание БАС. Выбор испытуемых проводится в соответствии с определенными ранее критериями включения.

Клинические исследования подразделяются на несколько видов [38]: пилотные, при которых определяются предварительные данные для планирования дальнейших этапов изучения свойств БАС; рандомизированные — когда пациенты распределяются по группам

лечения случайным образом, и все они имеют одинаковую возможность получить исследуемый или контрольный препарат (плацебо); контролируемые исследования, которые позволяют сравнить исследуемое БАС с препаратом, эффективность и безопасность которого хорошо известны: это может быть плацебо, стандартная терапия или отсутствие лечения вообще.

Данный вид исследования проводится в строгом соответствии с протоколом, мониторируется и т.д. Проспективное исследование проводится с делением участников на группы, которые будут или не будут получать исследуемое лекарственное средство до того, как наступили исходы. В отличие от него, в ретроспективном исследовании изучаются исходы проведенных ранее клинических исследований, то есть исходы наступают до того, как начато исследование.

В параллельном исследовании сравниваются две или более группы испытуемых, одна или более из которых получают исследуемый препарат, а одна группа является контрольной. Когортное исследование — это наблюдательное исследование, в котором выделенную группу людей (когорту) наблюдают в течение некоторого времени. Сравниваются исходы у испытуемых в разных подгруппах данной когорты, тех, кто подвергся или не подвергся (или подвергся в разной степени) лечению исследуемым препаратом.

В исследовании серии случаев наблюдают несколько индивидуумов, обычно получающих одинаковое лечение, без использования контрольной группы. Предпочтение отдается дизайну клинического исследования лекарственных средств, при котором обеспечивается получение наиболее достоверных данных, к примеру, при проведении проспективных контролируемых, сравнительных рандомизированных и, желательнее, двойных слепых исследований. Обычно эти исследования имеют сравнительный результат по отношению к существующей стандартной терапии [39].

В настоящее время основным направлением совершенствования системы клинических испытаний БАС является унификация методологических подходов, то есть проведение испытаний по стандартному плану с разработанными протоколами санитарно-биологических исследований эффективности и переносимости БАС. Кроме того, интенсивно разрабатываются высокочувствительные методы идентификации и количественного определения биологически активного компонента не только в составе самого БАС, но и в биологических средах организма, что позволяет выявить пути метаболизма этого соединения [40].

В заключение необходимо остановиться на относительно новой технологии «виртуального» (от англ. «virtual screening» — виртуальный отбор, проверка) скрининга — компьютерного моделирования активности БАС [41]. Анализируя химическое строение соединений с известной биологической активностью, можно выделить элементы, «ответственные» за проявление/отсутствие того или иного эффекта. На основе анализа появляется возможность конструирования молекул более активных и менее токсичных аналогов. Подобные методы позволяют предсказывать биологическую активность как уже имеющихся коллекций соединений, так и еще не существующих в природе веществ, то есть еще до синтеза прогнозировать их возможности воздействия на живые организмы. Эта технология включает в себя целый ряд компьютерных методов и алгоритмов, позволяющих осуществлять до-синтетический отбор органических структур до стадии синтеза и биологического тестирования, а также предсказывать многие фармакологические характеристики молекул.

Наиболее значимые современные подходы к виртуальному скринингу с некоторой долей условности подразделяются на две группы: методы на основе алгоритмов, позволяющих конструировать новые молекулы, исходя из информации о структурах уже известных активных соединений (ligand-based design), и методы на основе информации о структурах биологической мишени (target structure-based design) [42].

К первой группе относятся методы, которые включают в себя поиск по химической подструктуре БАС [43], поиск по коэффициенту подобия их определенных малых структурных фрагментов, так называемых «фingerprintов» (от англ. «fingerprints» — отпечатки пальцев) [44], а также поиск биоизостерных аналогов [45]. К принципиальным недостаткам таких методов можно отнести субъективность, которая выражается в приближении исследователей к уже известным химическим типам соединений при использовании концепции поиска по определенной подструктуре.

Наиболее распространенным из первой группы является метод QSAR («Quantitative Structure — Activity Relationship», или «количественное соотношение структура—активность»), который позволяет проводить количественное выражение взаимосвязи биологических свойств веществ с их структурой [46].

Методология QSAR сформировалась к середине 1960-х гг., ее основателем является американский исследователь Корвин Ганч. Этот метод широко используется для поиска корреляций между биологической

активностью, липофильностью и другими молекулярными характеристиками. Подобные корреляционные соотношения чрезвычайно важны для предсказания структурных модификаций химических соединений в связи с прогнозом их биологической активности. Именно в этой предсказательной силе и заключается основная ценность методологии QSAR для рационального синтеза лекарственных препаратов.

За последнее двадцатилетие методы, предложенные для прогноза спектра биологической активности соединений, претерпели существенные изменения. Эти изменения базируются на теоретическом анализе методики прогнозирования и опыте ее применения для поиска веществ с требуемыми свойствами.

Современная версия компьютерной системы предсказания спектра биологической активности PASS C&T (Prediction of Activity Spectra for Substances Complex & Training) включает в себя обучающую выборку, содержащую более 30000 БАС с известной биологической активностью, и охватывает более 400 фармакологических эффектов, механизмов действия, а также мутагенность, канцерогенность, тератогенность и эмбриотоксичность [47]. Биологическая активность соединений описывается в PASS C&T качественным образом (да/нет), выдаваемые результаты прогноза помимо названий активности включают в себя оценки вероятностей наличия или отсутствия каждой активности, имеющие значения от 0 до 1.

Прогноз в этой системе помогает определить, какие тесты наиболее адекватны для изучения биологической активности конкретного химического вещества и какие из данных веществ наиболее вероятно проявят требуемые эффекты. Тем не менее система PASS C&T не может предсказать, станет ли конкретное вещество лекарственным препаратом, поскольку она не учитывает такие факторы, как сравнительная оценка безопасности и клинической эффективности БАС, наличие для разработки и внедрения инвестиций и др.

В количественном отношении вторую группу методов ограничивает необходимость знания структуры исследуемой биологической мишени, формы и состава ее активного сайта связывания, а также особенностей взаимодействия известного лиганда с конкретной биомишенью. Технология HTS (High Throughput Screening — высокоскоростной скрининг), которая повсеместно используется в разработке лекарственных препаратов, предполагает использование виртуального скрининга как важной части селекции молекул. На этом принципе основаны методы 3D-молекулярного докинга, которые

на базе полученных экспериментальных данных позволяют строить трехмерные компьютерные модели, с помощью которых прогнозируется активность органических соединений. Однако применение этого метода в решении реальных задач виртуального скрининга сопряжено с целым рядом теоретических и практических проблем, резко ограничивающих возможности его прикладного использования [48]. Так, критическим фактором является ресурсоемкая задача построения трехмерных моделей взаимодействия лиганда и биомишени, для чего требуется высокопроизводительные вычислительные системы. Также имеется недостаточная изученность многих теоретических аспектов феномена лиганд-рецепторных взаимодействий, например, их динамика, возможная конформация лиганда и мишени, учет влияния молекул веществ, находящихся в растворе, и т.д.

Это приводит к тому, что во многих случаях использование молекулярного докинга не приводит к улучшению качества предсказания мишень-специфичной активности, по сравнению со значительно менее ресурсоемкими методами двумерного структурного подобия [49]. Все вышесказанное указывает на то, что на сегодняшний день подавляющее большинство компьютерных программ работает в условном приближении к изучению свойств БАС в эксперименте. Это происходит по причине рассмотрения белков как стационарных систем, при незначительных структурно-энергетических вариациях областей непосредственного связывания, что не может в полной мере отражать все закономерности взаимодействия в системе лиганд — биологическая мишень.

Таким образом, современная методология определения эффективности БАС исчисляется разнообразными подходами к изучению их свойств. Подобное исследование состоит из множества этапов, начиная от изучения самой химической структуры вещества и заканчивая клиническими испытаниями БАС, что сопряжено с определенными этическими проблемами. Обеспечить безопасность применения новых БАС невозможно без надежных методов контроля содержания в них активно действующих веществ и подтверждения подлинности заявляемых в составе продукции компонентов, что требует тщательнейшего отбора потенциально перспективных веществ уже на ранних стадиях исследования.

Существующая в настоящее время методология оценки риска применения БАС основывается на полной токсикологической оценке конкретного вещества и его составляющих и определении дозозависимости. Это предусматривает создание максимально эффективных с лечебной точки зрения препаратов при содержании

в них минимума субстанций, обладающих побочными действиями. При этом спектр биологической активности новых БАС может проявляться по-разному. Так, некоторые фармакологические эффекты обнаруживаются уже при первом тестировании на моделях «in vitro», другие — при изучении его действия на экспериментальных животных, третьи — при проведении клинических испытаний и последующем использовании препаратов в медицинской практике. Все это указывает на необходимость пристального внимания исследователей к появлению на рынке новых БАС, особенно в составе пищевых добавок, изучение действующего начала эффективности которых, а также механизмов физиологического действия затруднено в силу ряда различных причин.

Литература

1. Шустов Е.Б. Основные определения БАД и нормативное регулирование рынка БАД в России и за рубежом // ФАРМ-индекс. — 2005. — № 202. — С. 12–18.
2. Кузнецов А.М., Шимбаревский А.С. И зачем эти БАДы? (<http://badov.net>).
3. Поройков В.В. Компьютерное предсказание биологической активности веществ: пределы возможного // Химия в России. — 1999. — № 2. — С. 8–12.
4. Тутельян В.А., Аксюк И.Н., Батулин А.К. и др. Основные методические подходы к экспериментальной оценке эффективности БАД-парафармацевтиков: методические указания. МУК 2.3.2.721-98. — М.: Минздрав России, 1998. — 342 с.
5. Штыков С.Н., Русанова Т.Ю. Наноматериалы и нанотехнологии в химических и биохимических сенсорах: возможности и области применения // Рос. хим. ж. — 2008. — Т. LII, — № 2. — С. 92–100.
6. Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physico-chemical and environmental factors // Environ. Health. Perspect. — 2006. — Vol. 114. — N 2. — P. 165–172.
7. Vallet-Regi M. Nanostructured mesoporous silica matrices in nanomedicine // J. Intern. Med. — 2010. — Vol. 267. — N 1. — P. 22–43.
8. Zhang Y.Z., Su B., Venugopal J., Ramakrishna S., Lim C.T. Biomimetic and bio-active nanofibrous scaffolds from electrospun composite nanofibers // Int. J. Nanomedicine. — 2007. — Vol. 2. — N 4. — P. 623–638.
9. Hamilton R.F., Wu N., Porter D., Buford M. et al. Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity // Part. Fibre. Toxicol. — 2009. — Vol. 6. — P. 35–41.
10. Jia X., Xie Q., Zhang Y., Yao S. Simultaneous quartz crystal microbalance-electrochemical impedance spectroscopy study on the adsorption of anti-human immunoglobulin G and its immunoreaction at nanomaterial-modified Au electrode surfaces // Anal. Sci. — 2007. — Vol. 23. — N 6. — P. 689–696.
11. Погожева А.В., Васильев А.В. Проблемы оценки клинической эффективности БАД // Клин. мед. — 2007. — № 1. — С. 3–9.
12. Шеховцова Т.Н. Биологические методы анализа // Соросовский образоват. журн. — 2000. — Т. 6. — № 3. — С. 23–27.
13. Rodrigues E.G., Dobroff A.S., Taborda C.P., Travassos L.R. Antifungal and anti-tumor models of bioactive protective peptides // An. Acad. Bras. Cienc. — 2009. — Vol. 81. — N 3. — P. 503–520.
14. Balashova N.V., Park D.H., Patel J. et al. Interaction between leukotoxin and Cu,Zn superoxide dismutase in aggregatibacter actinomycetemcomitans // Infect. and Immun. — 2007. — Vol. 75. — N 9. — P. 4490–4497.
15. Ast J.C., Dunlap P.V. Phylogenetic analysis of the lux operon distinguishes two evolutionarily distinct clades of *Photobacterium leiognathi* // Arch. of Microbiol. — 2004. — Vol. 181. — N 5. — P. 352–361.
16. Samber De B., Evens R., Schamphelaere De K., Silversmit G. et al. A combination of synchrotron and laboratory X-ray techniques for studying tissue-specific trace level metal distributions in *Daphnia magna* // J. Anal. At. Spectrom. — 2008. Vol. 23. — P. 829–839.
17. Звездочкина Н.В., Муранова Л.Н., Андрианов В.В. и др. Локомоторные реакции и возбудимость нейронов в условиях блокады дофамина галоперидолом у беспозвоночных и позвоночных животных // Росс. физиол. журн. — 2004. — Т. 2. — № 11. — С. 1381–1392.
18. Евтюгин Г.А., Будников Г.К., Никольская Е.Б. Биосенсоры для определения ингибиторов ферментов в окружающей среде // Успехи химии. — 1999. — Т. 68. — № 12. — С. 1142–1167.
19. Будников Г.К. Биосенсоры как новый тип аналитических устройств // Соросовский образоват. журн. — 1996. — № 12. — С. 26–32.
20. Thevenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification // Biosens. Bioelectron. — 2001. — Vol. 16. — № 1–2. — P. 121–131.
21. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов / В кн. «Проблемы регуляции в биологических системах» (ред. А.Б. Рубин). — М.: Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2006. — С. 390–424.
22. Финкельштейн Е.Е., Курбатова С.В., Колосова Е.А. Исследование биологической активности структурных аналогов адамантана // Вестник СамГУ, Естественнонаучная серия. — 2002. — Т. 4. — № 26. — С. 121–128.

23. Яшин А.Я., Яшин Я.И. Новый прибор для определения антиоксидантной активности пищевых продуктов, биологически активных добавок, растительных лекарственных экстрактов и напитков // Приборы и автоматизация. — 2004. — № 11. — С. 45–48.
24. Евдокимов Ю.М., Саянов В.И., Скуридин С.Г. От жидких кристаллов к наноконструкциям ДНК // Мол. биол. — 2009. — Т. 43. — № 2. — С. 195–382.
25. Rizzo M.A., Davidson M.W., Piston D.W. Fluorescent protein tracking and detection: applications using fluorescent proteins in living cells // CSH Protoc. — 2009. — N 12. Pdb.top 64.
26. Wallrabe H., Elangovan M., Burchard A. et al. Confocal FRET microscopy to measure clustering of ligand-receptor complexes in endocytic membranes // Bio-phys. J. — 2003. — Vol. 85. — N 1. — P. 559–571.
27. Egner A., Hell S.W. Fluorescence microscopy with super-resolved optical sections // Trends Cell. Biol. — 2005. — Vol. 4. — P. 207–215.
28. Феофанов А.В. Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях // Успехи биол. химии. — 2007. — Т. 47. — С. 371–410.
29. Kohen E., Gatt S., Schachtschabel A. et al. Multiprobe fluorescence imaging and microspectrofluorimetry of cell transformation and differentiation: implications in terms of applied biochemistry and biotechnology // Biotechnol. Appl. Bio-chem. — 1999. — Vol. 29. — N 3. — P. 191–205.
30. Praus P., Kocisova E., Mojzes P. et al. Time-resolved microspectrofluorometry and fluorescence imaging techniques: study of porphyrin-mediated cellular up-take of oligonucleotides // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2008. — Vol. 1130. — P. 117–121.
31. Millot C., Millot J.M., Morjani H. et al. Characterization of acidic vesicles in multidrug-resistant and sensitive cancer cells by acridine orange staining and confocal microspectrofluorometry // J. Histochem. Cytochem. — 1997. — Vol. 45. — N 9. — P. 1255–1264.
32. Назарова А.И., Феофанов А.В., Кармакова Т.А. и др. Влияние заместителей на фотохимические и биологические свойства 13,15-N-циклоимидных производных хлорина р6 // Биоорг. химия. — 2005. — Vol. 31. — № 5. — P. 535–548.
33. Sharonov G.V., Feofanov A.V., Vocharova O.V. et al. Comparative analysis of proapoptotic activity of cytochrome c mutants in living cells // Apoptosis. — 2005. — Vol. 10. — N 4. — P. 797–808.
34. Kassab K. Evaluating the antitumor activity of combined photochemotherapy mediated by a meso-substituted tetracationic porphyrin and adriamycin // Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). — 2009. — Vol. 41. — N 11. — P. 892–899.
35. Espina V., Wulfkuhle J., Liotta L.A. Application of laser microdissection and re-verse-phase protein microarrays to the molecular profiling of cancer signal pathway networks in the tissue microenvironment // Clin. Lab. Med. — 2009. — Vol. 29. — N 1. — P. 1–13.
36. Хабриев Р.У., Денисов И.Н., Герасимов В.Б., Кукес В.Г. Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств. — М.: ФГУ НЦЭСМП Росздрава, 2005. — 360 с.
37. McMahon A.D., Conway D.I., Macdonald T.M., McInnes G.T. The unintended consequences of clinical trials regulations // PLoS Med. — 2009. — Vol. 3. — N 11. — P. e1000131.
38. Богданов А.Р., Погожева А.В., Васильев А.В. и др. Оценка клинической эффективности диетотерапии кардиохирургических больных // Вопр. питания. — 2007. — № 6. — С. 26–29.
39. Rock E.P., Molloy V.J., Humphrey J.S. GCP data quality for early clinical development // Clin. Cancer Res. — 2010. — Vol. 16. — N 6. — P. 1756–1763.
40. Астахова А.В., Лепяхин В.К. Неблагоприятные побочные реакции и контроль качества лекарств. — М.: «Когито-Центр», 2004. — 200 с.
41. Walters W.P., Stahl M.T., Murcko M.A. Virtual screening — an overview // Drug. Disc. Today. — 1998. — Vol. 3. — P. 160–178.
42. Sun H. Pharmacophore-based virtual screening // Curr. Med. Chem. — 2008. — Vol. 15. — N 10. — P. 1018–1024.
43. Merlot C., Domine D., Cleva C., Church D.J. Chemical substructures in drug discovery // Drug. Discov. Today. — 2003. — Vol. 8. — N 13. — P. 594–602.
44. Willett P. Chemical Similarity searching // J. Chem. Inf. Comput. Sci. — 1998. — Vol. 38. — N 6. — P. 983–996.
45. Patani G.A., LaVoie E.J. Bioisosterism: a rational approach in drug design // Chem. Rev. — 1996. — Vol. 96. — P. 3147–3176.
46. Зефирова О.Н., Папулин В.А. История QSAR. Ранние исследования количественной связи между структурой и биологической активностью органических соединений / В кн.: История химии: область науки и учебная дисциплина (ред. В.В. Лунина и В.М. Орла). — М.: Изд-во МГУ, 2001. — С. 60–73.
47. Поройков В.В., Филимонов Д.А., Глориозова Т.А. и др. Компьютерное предсказание биологической активности химических веществ: виртуальная хемогеномика // Информационный вестник ВОГиС. — 2009. — Т. 13. — № 1. — С. 137–143.
48. Тихонов А.В. Виртуальный скрининг в Интернет — новый подход к разработке лекарств // Нов. хирургический архив. — 2004. — Т. 2. — № 4. — С. 24–32.
49. Brown R.D., Martin Y.C. Use of structure-activity data to compare structure-based clustering methods and descriptors for use in compound selection // J. Chem. Inf. Comput. Sci. — 1996. — Vol. 36. — N 3. — P. 572–584.

SOME ASPECTS OF THE METHODOLOGY FOR DETERMINING THE EFFECTIVENESS OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

N.G. PLEHOVA¹, L.M. SOMOVA¹, K.A. DREKKO²

*¹ Establishment of the Russian Academy of Medical Sciences Research
Institute of Epidemiology and Microbiology, Siberian Branch of RAMS;*

² Pacific State Economic University, Vladivostok

This review analyzes current methods of determining the effectiveness of the safety of biologically active substances (BAS), starting with the traditional, conventional approaches to the latest high-tech ways to assess BAS.

Keywords: biologically active compounds, biochemistry, methods, and biocompatibility.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ НА ОСНОВЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ СИСТЕМ АВТОМАТИЗАЦИИ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

С.Г. МУХАЧЕВ*, В.М. ЕМЕЛЬЯНОВ, А.С. СИРОТКИН, М.В. ШУЛАЕВ

Казанский государственный технологический университет

Обзор с использованием собственных данных. Приводятся результаты работ в области автоматизации биотехнологических исследований, разработки оборудования и интенсивных процессов промышленного биосинтеза, переработки отходов, совершенствования процессов очистки сточных вод и повышения эффективности биотехнологических производств на основе комплексного использования сырья.

Ключевые слова: промышленная биотехнология, микробиологические технологии, автоматизация, очистка сточных вод.

Введение

Развитие промышленной биотехнологии является необходимым условием эффективной модернизации российской экономики. В советской и новейшей истории отношение руководства страны к этому направлению приводило и к взлету, и к падению промышленного крупнотоннажного производства кормовых добавок, ферментов, аминокислот, антибиотиков, лекарственных препаратов и др. В силу стратегических просчетов большинство продуктов российской биотехнологии не смогло в рыночных условиях быть конкурентоспособным по сравнению с зарубежными аналогами и разработками ведущих фирм.

Однако в последние годы наметилась тенденция к возрождению интереса и финансированию работ в области промышленной биотехнологии. В частности, в Республике Татарстан разработана концепция и принята региональная целевая программа «Развитие биотехнологии в Республике Татарстан на 2010–2020 гг.», которая в числе других важных мероприятий предполагает строительство завода по глубокой переработке зерна с целью получения углеводного сырья для пищевой промышленности и для создания современных производств микро-

биологического синтеза биологически активных веществ. В этом отношении может оказаться полезным опыт, накопленный Казанским государственным технологическим университетом (КГТУ) в сфере биотехнологии.

Становление исследований в области промышленной биотехнологии в КГТУ определялось общероссийскими тенденциями и условиями. За прошедшие годы сформировалась научная школа, разработано и создано собственными силами уникальное современное технологическое оборудование, которое позволяет решать актуальные научные задачи в области управляемого биосинтеза.

Первые биотехнологические исследования в Казанском химико-технологическом институте (КХТИ) связаны с выпускником кафедры «Автоматизация промышленных процессов» 1961 года Ш.Г. Еникеевым, вернувшимся из аспирантуры Московского института химического машиностроения (МИХМ). Под руководством проректора МИХМа профессора Николаева П.И. он защитил кандидатскую диссертацию по математическому моделированию процессов культивирования микроорганизмов в реакторе идеального смешения. Энергия и инициативность доцента Ш.Г. Еникеева, привлечение им инициативных молодых сотрудников, всесторонняя поддержка ректора КХТИ П.А. Кирпичникова позволили в короткие сроки заявить научному сообществу страны о рождении нового творческого коллектива. Подтверждением этому явилось открытие бюджетного финансирования в рамках направления «Молекулярная биология и генетика», курируемого академиком Ю.А. Овчинниковым. Были выполнены работы по внедрению

© 2010 г. Мухачев С.Г., Емельянов В.М., Сироткин А.С., Шулаев М.В.

* **Автор для переписки:**

Мухачев С.Г.

Казанский государственный технологический университет

420015 Казань, ул. К. Маркса, 68

разработанного Ш.Г. Еникеевым, В.М. Емельяновым, Н.В. Гудиным метода интенсификации аэробных процессов ферментации с помощью переносчиков кислорода [1].

В 1976 г. при кафедре химической кибернетики была создана самая крупная в СССР отраслевая лаборатория Главмикробиопрома «Инженерные проблемы биотехнологии». Лаборатория не только выполняла поисковые работы в области биотехнологии, но и сама разрабатывала методические основы и технические средства для выполнения исследований стехиометрии и кинетики микробиологических процессов, корректной оценки технологических характеристик новых штаммов промышленных микроорганизмов. К середине 80-х годов отраслевая лаборатория стала ведущей в стране организацией в области интенсификации переноса кислорода в системах ферментации и автоматизации научных исследований аэробного биосинтеза. В это время велась проработка вопроса о строительстве Казанского завода по производству лизина. Для обеспечения научного сопровождения этого проекта параллельно с лабораторией был создан Казанский филиал ВНИИБиотехнологии.

Основные силы лаборатории, обеспечивающие работы в области АСНИ, перешли в филиал, а группа внедрения переносчиков кислорода осталась в КХТИ. Директором филиала был назначен Ш.Г. Еникеев, а заведующим кафедрой химической кибернетики и научным руководителем отраслевой лаборатории — доцент В.М. Емельянов. В связи с изменением общей ситуации в стране и другими причинами Казанский филиал ВНИИБиотехнологии был реформирован и преобразован в Казанский биоинженерный институт. Однако поле деятельности для института оказалось недостаточным в связи со свертыванием крупнотоннажной биотехнологической промышленности.

В результате часть ведущих специалистов института потерял. Вернулся в КХТИ доцент В.В. Нагаев, перед которым была поставлена задача интенсификации процессов очистки сточных вод. Позднее вернулся доцент С.Г. Мухачев, возглавивший направление по интенсификации процессов спиртового производства. Эти направления и стали одними из ведущих в настоящее время.

Автоматизация научных исследований

Биореакторные установки. В начале 70-х годов XX века в СССР практически отсутствовала возможность оснащения подразделений вузов современным лабораторным технологическим оборудованием для

асептического непрерывного культивирования микроорганизмов. Такое оборудование могло быть закуплено лишь за рубежом. Производимые в единичных экземплярах Специальным конструкторским бюро биологического приборостроения (СКБ БП) АН СССР (г. Пушкино-на-Оке) ферментационные установки АНКУМ, АК-10, АК-210 были жестко фондированы и технически относились к системам с аналоговым управлением, что снижало их возможности по сравнению с зарубежными разработками.

Поэтому лабораторией инженерных проблем биотехнологии была поставлена задача создания необходимого оборудования нового поколения с цифровым, а не аналоговым управлением. Пилотный ферментер периодического действия «Фермотрон» с цифровым управлением, разработанный в Пенсильванском университете (США) А. Хемфри и В. Армиджером, был чрезвычайно дорогим и не мог служить прототипом для оснащения вузовских лабораторий. Решению поставленной задачи способствовали многолетние творческие связи с ведущими биотехнологами США А. Хемфри, Д. Вангом, Ч. Куни, Л. Эриксоном, Д. Бейли в рамках советско-американского «Проекта-2». На основе передовых взглядов того времени были сформулированы технические требования к автоматизированному лабораторному измерительному комплексу «Биотрон» [2]. Системно-технические принципы построения комплекса и конструкторская документация были разработаны старшим преподавателем Валеевым Р.И. Комплекс «Биотрон» обеспечивал проведение в контролируемых условиях исследований стехиометрии и кинетики процессов микробиологического синтеза. Реализация всех операций, кроме первоначальной загрузки среды и инокулирования, а также смены приемных емкостей в весовом проботборнике, осуществлялась в автоматическом режиме под управлением ЭВМ СМ-2. СМ-2 обеспечивала в режиме реального времени сбор и обработку информации, расчет мгновенного материального баланса в интервалах 0,5 и 15 мин., управляла исполнительными механизмами — шестиканальным дозатором жидких сред, двухканальным дозатором компонентов газового питания, устройством асептического отбора проб, системой автоматического разбавления и повторного инокулирования. Комплекс обеспечил высокую воспроизводимость экспериментов и использовался для получения технологических характеристик штаммов-продуктов биологически активных веществ. Комплекс позволял реализовывать периодические, непрерывные и отъемно-доливные процессы культивирования аэробных и факультативно-анаэробных

микроорганизмов с использованием как стандартных алгоритмов управления и аналоговых регуляторов, так и специально разрабатываемых программ «ситуационного» управления. Обеспечивая высокую производительность труда исследователя, комплекс в то же время предъявлял и повышенные требования к квалификации всего персонала.

Конструктивные решения комплекса базировались на целом ряде разработанных системно-технических принципов, обеспечивающих гибкость, совместимость, оперативную заменяемость его модулей. Особенностью комплекса была возможность проведения экспериментов с использованием плотных культур, что обеспечивалось высокими массообменными характеристиками биореактора (до 22 г O_2 /л·час — на сульфитной модели, до 15,5 г O_2 /л·час — в процессах культивирования этанолюкисляющих дрожжей), не достижимыми в известных аппаратах того времени. Конструкция оригинального диспергатора газа была позднее доработана для условий промышленного применения и запатентована [3].

Диалог с оператором, терминальные станции оператора-технолога и исследователя, звуковое информирование персонала об изменениях параметров процесса, времени выполнения ручных операций пробоотбора и др. обеспечили преимущества комплекса на весь период его эксплуатации (1976–1986 гг.).

Опыт создания и эксплуатации комплекса «Биотрон» послужил основой для разработки более простых установок для целей обеспечения научных исследований и учебных практикумов, позволяющих измерять параметры процессов культивирования аэробных микроорганизмов на основе газового баланса.

Биотехнологический комплекс, удовлетворяющий требованиям тиражирования, был сконструирован и создан в 1989 г. Основу комплекса составлял биореактор объемом 1 л, установленный непосредственно в ультратермостате и снабженный верхним приводом. Комплекс включал в себя систему газового питания и газоанализа (кислород, углекислый газ), измерения и регулирования технологических параметров (расходы компонентов, вращение мешалки, температура, давление, рН среды и др.), четырехканальный дозатор жидких сред. Позднее был разработан легко разборный удобный в эксплуатации биореактор объемом 6 л, использующийся и в настоящее время, как в научных исследованиях, так и в учебном процессе.

С использованием комплекса были разработаны новые способы получения продуктов микробиологического синтеза, защищенные авторскими свидетельствами и патентами [4, 5].

Подобными аппаратами оснащена учебно-исследовательская лаборатория энерго- и ресурсосбережения в биотехнологии. Это позволило расширить тематику работ, выполняемых студентами и аспирантами ряда кафедр университета.

Установка непрерывной полимеризации. Вторым направлением в автоматизации исследований являлась разработка и создание установки для исследования и отработки режимов получения полимеров. В настоящее время одной из серьезных задач биотехнологической науки является создание биоразлагаемых полимеров для производства экологически безвредных, биологически легко утилизируемых упаковочных материалов.

Программно-аппаратный комплекс лабораторной технологической линии полимеризации обеспечивает управление периодическими и непрерывными процессами получения полимеров, количественную оценку технологических показателей исследуемых процессов. Комплекс включает в себя по 2 аппарата подготовки катализатора и шихты, что позволяет в непрерывном режиме варьировать соотношение компонентов. Непрерывная полимеризация осуществляется в двух последовательно включенных в схему реакторах-полимеризаторах, снабженных механическими системами перемешивания. Продукт реакции направляется в крошкообразователь-отмывочник и далее в дегазаторы, имеющие мешалки и смотровые окна. Затем образовавшаяся пульпа насосом подается в отмывочный аппарат. После отмывки пульпа сбрасывается на сито, где происходит отделение воды и собирается отмывтый полимер. Общий вид комплекса показан на рисунке 1.

Созданный в лабораторном варианте данный комплекс успешно эксплуатируется в Научно-техническом центре ОАО «Нижекамскнефтехим».

Комплекс имеет модульную структуру, что позволяет менять его конфигурацию и программное обеспечение для реализации различных режимов полимеризации. Работа автоматических устройств основана на использовании распределенной системы сбора данных и управления GENIE фирмы Advantech. Пакет GENIE является инструментальным средством для создания программного обеспечения сбора данных и оперативного диспетчерского управления (SCADA) и дает возможность одновременного исполнения до 8 задач, каждая из которых отражается в своем окне и имеет свои собственные параметры.

В настоящее время пакет GENIE применяется при построении управляющих систем для биологических реакторов и ферментализеров.



Рис. 1. Общий вид установки непрерывной полимеризации

Совершенствование биотехнологических процессов

Биотехнологическое оборудование для ликвидации нефтяных загрязнений. Дальнейшие технические разработки, продолжающиеся и в настоящее время, были связаны с созданием мобильных технологических комплексов для культивирования микроорганизмов — деструкторов нефтяных загрязнений. Такие комплексы позволяют нарабатывать высоко активную биомассу деструкторов непосредственно на месте загрязнения и, таким образом, оперативно решать проблемы экологической безопасности, осуществляя биологическую реабилитацию загрязненных почв и водоемов. Комплекс может быть использован в мобильных условиях для очистки нефтяных скважин от отложений парафинов на основе специальной технологии по выращиванию биопрепаратов, а также для очистки резервуаров и хранилищ нефтепродуктов [5–7].

Повышение эффективности дрожжегенерации спиртовых дрожжей и эффективности бро-дильных производств. Решая задачу разработки научно-технических основ повышения эффективности производства биотоплив, коллектив лаборатории инженерных проблем биотехнологии сосредоточил усилия на совершенствовании процессов получения биоэтанола.

С целью повышения активности и плотности посевных дрожжей был отработан процесс получения чистой культуры в аэробном режиме с соблюдением требований асептики [8–12]. В этом направлении работа

под руководством Емельянова В.М. и Мухачева С.Г. была продолжена Александровской Ю.П., Шавалиевым М.Ф. в части совершенствования конструкции инокулятора. Были разработаны модели функционирования аппаратов с мембранными устройствами «беспузырькового» подвода кислорода [13, 14] и создана конструкция инокулятора без подвижных механических узлов [15] с удельной поверхностью мембранного элемента $155 \text{ м}^2/\text{м}^3$. Удельная скорость диффузии кислорода через мембрану достигает $10 \text{ г}/\text{м}^2 \cdot \text{час}$, не зависит от режима течения жидкой фазы и определяется только перепадом парциального давления кислорода (таблица 1). Моделирование процесса на основе полученных экспериментальных данных показало, что с использованием разработанного инокулятора может быть создан двух-трехсекционный аппарат промышленного назначения, обеспечивающий в непрерывном режиме подпитку дрожжегенератора инокулятом с содержанием активных клеток до $10 \text{ гАСД}/\text{л}$ при удельной скорости жидкостного потока $0,16 \text{ час}^{-1}$. При этом режиме продуктивность инокулятора превышает $2 \text{ г}/\text{л} \cdot \text{час}$ (рис. 2).

Таблица 1

Диффузия кислорода через деформируемую мембрану

Перепад давления кислорода	Площадь поверхности мембраны	Скорость диффузии кислорода через мембрану	Удельная скорость диффузии кислорода через мембрану
МПа	см ²	г O ₂ /час	г O ₂ /м ² ·час
0,05	186,9	0,0365	1,95
0,10	192,5	0,0851	4,42
0,15	197,2	0,1237	6,27
0,20	206,5	0,1697	8,22
0,25	356,3	0,2317	6,50
0,30	390,0	0,3027	7,59
0,35	464,8	0,4791	10,31
0,40	522,8	0,5702	10,91

Из рисунка 2 следует, что максимальная продуктивность достигается в области $0,23 \text{ час}^{-1}$ и составляет $2,83 \text{ гАСД}/\text{л} \cdot \text{час}$. Следует отметить, что увеличение скорости протока с $0,1$ до $0,16 \text{ час}^{-1}$ не вызывает существенного роста концентрации остаточных сахаров. Дальнейшее увеличение скорости разбавления приводит к значительному росту концентрации остаточных сахаров от $1 \text{ г}/\text{л}$ при $D=0,17 \text{ час}^{-1}$ до $11 \text{ г}/\text{л}$ при $D=0,2$

час⁻¹. Но поскольку инокулят используется для засева дрожжегенератора, наличие остаточных сахаров в его выходном потоке не является недостатком и не ухудшает общие показатели спиртового производства.

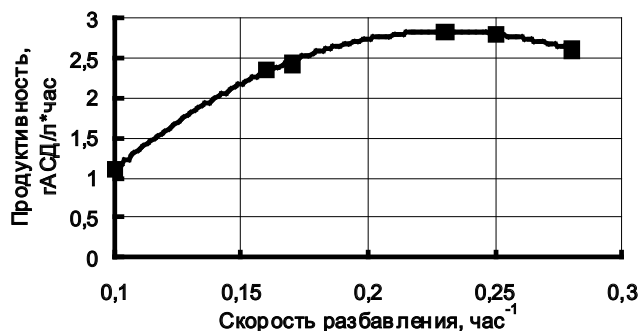


Рис. 2. Продуктивность инокулятора

Дальнейшее выращивание посевного материала до концентрации 60–80 гАСД/л предполагается осуществлять в секционированном биореакторе интенсивного действия, разрабатываемом в настоящее время. Сокращение числа операций перелива засевных дрожжей, повышение их концентрации и соблюдение требований асептики исключают заражение посторонней микрофлорой и блокируют рост случайно попавших посторонних клеток за счет высокой концентрации метаболитов дрожжевой культуры.

Поставленные цели достигаются уже при использовании двухсекционного дрожжегенератора, общий вид и принципиальное устройство которого представлены на рисунке 3. Особенностью конструкции является наличие регулятора угла атаки дисковых диспергаторов газа, а также применение особым образом перфорированных поверхностей всех элементов конструкции, обеспечивающих турбулизацию газо-жидкостной среды в аппарате.

Высокий уровень засева на каждом этапе культивирования посевных дрожжей обеспечит повышение производительности и экономию субстрата за счет относительного снижения затрат сахаров на поддержание жизнедеятельности микроорганизмов по сравнению с затратами на синтез клеточной биомассы. Кроме того, испытания биореактора интенсивного действия объемом 10 м³ при выращивании посевных культур аэробных микроорганизмов показали возможность двукратного снижения расхода электроэнергии на синтез 1 кг активной биомассы.

Таким образом, технологическая линия асептической дрожжегенерации будет состоять только из трех

аппаратов — инокулятора, секционированного биореактора чистой культуры и дрожжегенератора, работающих в непрерывном или отъемно-доливном режимах.

Опыт реализации отъемно-доливных операций в аппарате объемом 16 м³ в условиях Шумбутского спиртзавода (Республика Татарстан) показал, что число стадий отъема-долива ограничено 5–6 операциями в полусептических условиях. Применение предлагаемой аппаратуры за счет жесткого соблюдения требований асептики может увеличить число операций отъема-долива в 5–10 раз, то есть фактически перейти к непрерывному асептическому производству высокоактивных посевных культур.

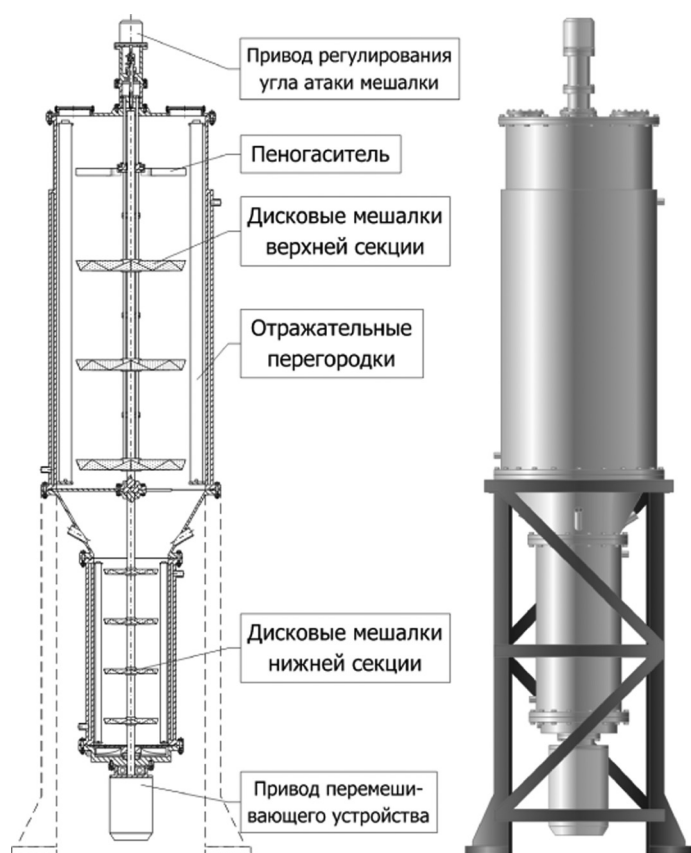


Рис. 3. Секционированный биореактор чистой культуры

Следует особо отметить, что экспериментально в промышленных условиях была доказана более высокая активность посевных дрожжей, выращенных по аэробной технологии (рис. 4) [8]. В условиях Александровского спиртового завода (Республика Татарстан) была выращена стерильная культура спиртовых дрожжей с приростом концентрации клеток (биомассы), в 10 раз превышающим прирост концентрации дрожжей, полученных анаэробно в соответствии с заводским регламентом [9, 11, 16].

В результате использования культуры, выращенной в условиях аэрации, повышена эффективность спиртового производства и получен положительный эффект:

- на 20–25% сокращена продолжительность процессов дрожжегенерации в дрожжанках и возбраживателе, а также продолжительность процесса брожения в бродильных чанах;
- на 30% снижено количество несброженных углеводов в бражке;
- на 1/3 снижен расход зерна на стадии получения засеваемых дрожжей.

В настоящее время организация масштабного производства топливных спиртов затрудняется нерешенной проблемой утилизации барды.

Повышение эффективности переработки спиртовой барды. В КГТУ (КХТИ) разработана технология повышения производительности цеха производства кормовых дрожжей, принципиальной новизной которой является максимальная утилизация растворимых сухих веществ питательной среды за счет использования смешанной культуры дрожжей с оптимальным соотношением количества клеток родов *Candida* и *Saccharomyces*, выбора оптимальных режимных параметров процесса, включая состав минерального питания, интенсификации массообмена за счет использования переносчика кислорода.

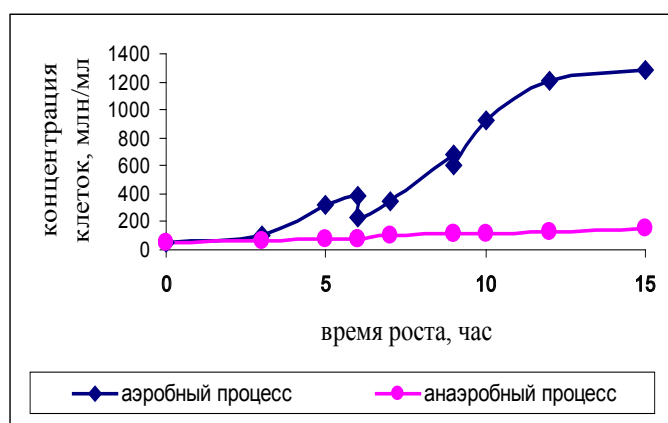


Рис. 4. Сравнительная динамика биомассы дрожжей в аэробном с подпиткой субстратом и в анаэробном процессах дрожжегенерации

В результате на Шумбутском спиртзаводе Республики Татарстан:

- проведены лабораторные и опытно-промышленные испытания с использованием переносчика кислорода по аэробному наращиванию смешанной культуры, свидетельствующие о высокой скорости синтеза белка при росте на средах, содержащих барду и ферментализат

ржаного зерна (который в дальнейшем может быть заменен более дешевыми гидролизатами или ферментализатами органических отходов) [8];

- получено экспериментальное подтверждение совместимости выбранных дрожжевых культур в лабораторных и промышленных условиях в периодических и непрерывных режимах культивирования;
- в промышленных условиях получено 10% увеличение производительности цеха кормовых дрожжей без модернизации производства [17];
- проведен расчет материального баланса прогнозируемого процесса для батареи аппаратов с применением дрожжегенераторов разного объема; показано, что даже без модернизации дрожжерастильных аппаратов только за счет дополнительного дрожжегенератора производительность цеха переработки барды может быть увеличена на 30% [18].

Интенсификация процессов очистки сточных вод. Для успешного решения задач, связанных с прогнозированием, оперативным управлением и контролем качества процесса водоочистки, необходимо комплексное описание гидродинамических, гидрохимических и гидробиологических процессов.

Проведение имитационных экспериментов позволило получить адекватную модель процесса биологической очистки сточных вод ОАО «Нижнекамскнефтехим». На имитационной модели была проанализирована работа системы очистки в режимах нормальной эксплуатации и в режиме залпового сброса. Проверка работоспособности разработанной математической модели системы очистки стоков показала достаточно хорошую близость расчетных и экспериментальных данных. Относительная погрешность расчета составила 3%.

С точки зрения практики эксплуатации биологических очистных сооружений, определяющей является экспертная роль компьютерного комплекса по анализу экстремальных ситуаций, а также по обеспечению экономической эксплуатации оборудования в номинальных режимах. Так, для промышленных систем аэрации получены оптимальные значения расхода воздуха (в 2–2,5 раза ниже существующих), позволяющие значительно снизить энергозатраты при сохранении качества очищенной воды [19].

Проведены исследования по изучению возможности улучшения показателей биоочистки сточных вод нефтехимических производств, в частности, ОАО «Нижнекамскнефтехим» путем использования порошкообразных сорбентов на стадии аэробной обработки в аэротенках. Для моделирования биосорбционного процесса

в качестве адсорбента использовали цеолитсодержащую породу (ЦСП) Татарско-Шатрашанского месторождения (Республика Татарстан). Цеолитсодержащая порода является активной загрузкой, так как обладает сравнительно развитой системой пор и удовлетворительными адсорбционными свойствами.

Аэробные биосорбционные технологии очистки сточных вод химических и нефтехимических производств основаны на применении иммобилизованных биоценозов на основе культур активного ила и высокоразвитой биопленки. Эффективность биосорбционных систем очистки сточных вод была обеспечена по ряду показателей: более глубокому удалению аммонийного азота в ходе процесса нитрификации — на 46%; значительному снижению концентрации нефтепродуктов — на 75%; снижению илового индекса — на 20%; более стабильному протеканию процесса очистки в «залповых» режимах и обеспечению более глубокого удаления химического потребления кислорода (ХПК) и более высоких скоростей биоокисления.

Проведено комплексное исследование биосорбционной обработки жидких отходов машиностроительных предприятий в анаэробных условиях на стоках ФГУП «Казанское авиационное производственное объединение им. С.П. Горбунова», ОАО «Казанское моторостроительное производственное объединение», ОАО КамАЗ и ОАО «Гальванические покрытия» (г. Чистополь).

Для повышения эффективности процесса очистки сточных вод другого химического объекта — производства серосодержащих тиокольных каучуков ОАО «Казанский завод СК» в пусковой период был предложен биосорбционный метод с загрузкой порошкообразного сорбционного материала — золы ТЭЦ в зону аэрации аэротенков. Технологические аспекты облегчения пуска заключались в накоплении активного ила, защищенного от токсического действия компонентов поступающей воды за счет их первичной адсорбции на поверхности золы и обладающего высокой биологической активностью и хорошими седиментационными свойствами [20].

Радикально улучшенные показатели состояния активного ила могли быть следствием процессов агрегации частиц золы с хлопьями активного ила. Зола, поверхность которой имеет катионный характер вследствие значительных количеств Fe^{3+} и Al^{3+} , выступает в качестве коагулянта хлопьев активного ила, имеющих в интервале значений рН от 4 до 9 отрицательный заряд, вызывает их агрегирование и обеспечивает хорошую седиментацию активного ила.

Кроме коагуляции, в биосорбционной системе происходил биологический процесс агрегации золы с

илом. После 2–3 нед. работы установки наблюдалось образование устойчивой биопленки на относительно ровной поверхности частиц золы — толщиной $\approx 0,016$ мм, а в «глубоких» впадинах $\approx 0,08$ мм.

Для анаэробной обработки жидких отходов ряда машиностроительных предприятий, в частности для очистки стоков гальванических производств ФГУП «КАПО им. С.П. Горбунова», содержащих ионы $Cr(VI)$, $Mn(VII)$, $Fe(II)$, $Cd(II)$, $Zn(II)$ и $Cu(II)$ [6] и отработанных смазочно-охлаждающих жидкостей (СОЖ), содержащих индустриальное масло, этанол-амин, полигликоли и эмульгатор металлообрабатывающего производства ОАО КМПО, был испытан биосорбер, оснащенный перемешивающим устройством барабанного типа с загрузкой из зернистого адсорбента. В качестве адсорбентов исследовались различные адсорбционные материалы, в том числе природного происхождения, а также отходы производств.

Эффективность биологической очистки сточных вод в значительной степени определяется протеканием совокупности биосорбционных процессов, а именно:

- иммобилизацией микробных клеток на поверхностях адсорбционных материалов;
- адгезионно-сорбционным изъятием загрязняющих веществ биопленкой;
- сорбцией примесей, в том числе токсичных компонентов сточных вод на поверхности адсорбента;
- биологическим окислением загрязняющих веществ микроорганизмами, закрепленными на поверхности сорбента.

Научно-прикладные исследования биосорбционных процессов в КГТУ были организованы и развиты на кафедре химической кибернетики под руководством доцента Нагаева В.В. [24], а позднее и на кафедре промышленной биотехнологии его учениками и последователями.

Комплексная переработка возобновляемого растительного сырья. Существенным результатом выполненных исследований в области промышленной биотехнологии явилось понимание того, что эффективность биотехнологической переработки сырья, прежде всего, сельскохозяйственной продукции и растительных отходов, определяется уровнем комплексирования технологических процессов и спектром получаемой при этом продукции. Например, при переработке сахарной свеклы оптимальная массовая доля биоэтанола в совокупном продукте составляет 6,5% при доле кормовых дрожжей до 80%. При этом в стоимостном выражении определяющее место занимает пищевой пектин. Общая

стоимость «дополнительной» к биоэтанола продукции при этом составит 75–77 % [25].

При формировании агропромышленного комплекса с целью получения энергоносителей из возобновляемого органического сырья важнейшей проблемой построения безотходного производства является использование дополнительных ресурсов [26]. Таким ресурсом в условиях превалирования зернового хозяйства является не только некондиционное зерно, но, прежде всего, солома. Половина соломы в настоящее время в Республике Татарстан просто запахивается в почву. Древесные низкопородные насаждения также используются в республике неэффективно. До 80% расчетной лесосеки по осине и березе хронически остается неосвоенной. Выполненные расчеты показали, что за счет неиспользуемых ресурсов целлюлитического сырья в Республике Татарстан может ежегодно производиться до 5000000–10000000 т энергоносителей (биоэтанола и биогаза). При этом вторичной барды, содержащей остаточные количества биогенных элементов, будет образовываться более 1000000 м³/сут. Естественно, что кормовые дрожжи надо сепарировать, а испарять вместе с дрожжами всю эту воду экономически нецелесообразно. Близость предприятий по производству энергоносителей к сельскохозяйственным угодьям, обеспечивающим их сырьем, дает возможность получения зеленых кормов с прудов биологической очистки стоков при утилизации низкопотенциального тепла практически круглогодично. Кроме того, открываются возможности развития прудовых рыбоводческих хозяйств, малых сопутствующих наукоемких предприятий по выпуску дополнительных видов продукции, повышающих экономические показатели агропромышленных объединений.

Заключение

На основании проведенного анализа можно сделать такие выводы:

- Разработанные лабораторные биотехнологические комплексы должны составить основу технического обеспечения биотехнологического образования в университете, включая подготовку кадров высшей квалификации.

- При разработке современных биотехнологий необходимо сопряженно решать проблемы совершенствования аппаратного оформления, выбора вида сырья, определения спектра планируемой продукции. Технологический потенциал существующих промышленных штаммов микроорганизмов позволяет при использовании плотных аэробных и факультативно-анаэробных культур микроорганизмов повышать продуктивность биореакторов

в несколько раз за счет интенсификации массообмена кислорода использованием предложенных конструкций аппаратов.

- Комплексование производств биотехнологической продукции, организация агропромышленных объединений обеспечат конкурентоспособность создаваемых биотопливных производств. Программа развития биотехнологии в Республике Татарстан должна строиться на базе производств по комплексной переработке малоиспользуемого целлюлитического сырья лесного хозяйства, отходов зернового хозяйства (солома) и других органических отходов с обеспечением утилизации остаточных количеств биогенных элементов в замкнутом цикле водооборота.

Литература

1. Еникеев Ш.Г., Емельянов В.М. Метод «диффузионного шунта» для интенсификации транспорта кислорода в процессах ферментации // Микробиологическая промышленность. — 1977. — № 9. — С. 6–9.
2. Автоматизированный исследовательский комплекс «Биотрон» / Отчет: Отраслевая научно-исследовательская лаборатория инженерных проблем биотехнологии Главмикробиопрома. - 128-77; № ГР.76024408; Т.2. — Казань, 1979. — 256 с.
3. Пат. 2021849. Перемешивающее устройство для многофазных сред / С. Г. Мухачев, Р. И. Валеев, Ш. Г. Еникеев и др. — опубл. 30.10.1994.
4. А.С. 4453123/13 Способ получения L-лизина / В.М. Емельянов, Л.А. Музыченко, И.С. Владимирова и др. — заявл. 28.12.89.
5. Пат. 1559696 Способ культивирования микроорганизмов / Емельянов В.М., Владимирова И.С., Еремина Н.А. — заявл. 20.05.88.
6. Emelyanov V.M., Sakhno T.V., Kurashov V.M., Skvortsov A.P. Recovery of soil become degraded owing to simultaneous contamination with petroleum and salted with oil-production waters. ConSoil 2000, Seventh International FZK/TNO conference on contaminated soil, Germany. — 2000. — P. 1240–1241.
7. Emelyanov V.M., Sakhno T.V., Kurashov V.M. Intensification of oil spills biodegradation based on the controlling of the electrokinetic characteristics of biopolymers of hydrogencarbondegrading microorganisms / ISEB 99-Meeting Biopolymers. 2–5 March, 1999. — Leipzig, Germany, 1999. — P. 50.
8. Пат. 2136746 Способ культивирования дрожжей для спиртового производства / В.М. Емельянов, Р.Р. Шайхутдинов, И.С. Владимирова и др. — заявл. 17.08.98, опубл. 10.09.99.
9. Филиппова Н.К., Емельянов В.М., Владимирова И.С., Валеева Р.Т. Разработка интенсивной технологии аэробно-

- го культивирования чистой культуры спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Биотехнология. — 2002. — № 1. — С. 49–53.
10. Емельянов В.М., Александровская Ю.П., Еналеев Р.Ш. и др. Аппаратурно-технологическое оформление участка аэробной генерации спиртовых дрожжей. / III междунар. научно-практич. конф., посвященная 70-летию создания ВНИИ пищевой биотехнологии. Тез. докл. — М.: Пищ-пром, 2001. — С. 72–76.
 11. Владимирова И.С., Филиппова Н.К., Емельянов В.М., Валеева Р.Т. Интенсивная технология дрожжегенерации / 1-й Международный конгресс «Биотехнология — состояние и перспективы развития». Тез. докл. — М., 2002. — С. 64–70.
 12. Емельянов В.М., Владимирова И.С., Александровская Ю.П. и др. Биотехнологический комплекс участка чистой культуры спиртовых дрожжей / 1-й Международный конгресс «Биотехнология — состояние и перспективы развития». Тез. докл. — М., 2002. — С. 45–47.
 13. Мухачев С.Г., Александровская Ю.П., Филиппова Н.К., Емельянов В.М. Кинетика аэробного культивирования спиртовых дрожжей в мембранном биореакторе // Вестник КГТУ. — Казань, 2003. — № 2. — С. 168–172.
 14. Мухачев С.Г., Емельянов В.М., Александровская Ю.П. Аэробное выращивание посевной культуры сахаромикетов в биореакторе с мембранной стерилизацией кислорода // Биотехнология. — 2005. — № 3. — С. 71–78.
 15. Аппаратурное оснащение и совершенствование аэробных технологий получения посевных материалов. Разработка инокулятора вытеснения с мембранным устройством стерилизации кислорода: Отчет о НИР / № ГР. 01200610996; инв. № 02.2.007 04215. — Казань, ООО «Биотехпродукция», 2007. — 50 с.
 16. Филиппова Н.К. Аэробное культивирование чистой культуры спиртовых дрожжей: автореф. дисс.... канд. техн. наук. — Казань, 2004. — 20 с.
 17. Валеева Р.Т., Мухачев С.Г., Емельянов В.М. и др. Использование спиртовых дрожжей в производстве кормовых препаратов на основе барды // Производство спирта и ликероводочных изделий. — 2006. — № 4. — С. 20–21.
 18. Мухачев С.Г., Валеева Р.Т. Расчет материального баланса цеха кормовых дрожжей // Производство спирта и ликероводочных изделий. — 2007. — № 1. — С. 8–9.
 19. Сироткин А.С., Понкратова С.А., Шулаев М.В. Современные технологические концепции аэробной биологической очистки сточных вод. — Казань: КГТУ, 2002. — 160 с.
 20. Сироткин А.С., Шулаев М.В., Нагаев В.В. Применение биосорбционного метода для очистки сточных вод крупных химических и нефтехимических предприятий / Деп. в ОНИИТЭХИМ г. Черкассы от 2.10.92 г. № 301-ХП92.
 21. Нагаев В.В., Шулаев М.В., Сироткин А.С., Емельянов В.М. Разработка биосорбционной технологии очистки хромсодержащих сточных вод // Химическая промышленность. — 1998. — № 3. — С. 33–35.
 22. Сироткин А.С. Технологические и экологические основы биосорбционных процессов очистки сточных вод: автореф. дисс... докт. техн. наук. — Казань, 2003. — 40 с.
 23. Шулаев М.В. Научные основы обезвреживания жидких отходов гальванических и металлообрабатывающих производств с использованием аэробной биосорбционной технологии: автореф. дисс... докт. техн. наук. — Казань, 2009. — 40 с.
 24. Нагаев В.В., Сироткин А.С., Понкратова С.А. Система имитационного моделирования процесса водоочистки в промышленном аэротенке / В кн.: Массообменные процессы и аппараты химической технологии. — Казань, 1997. — С. 22–29.
 25. Мухачев С.Г., Владимирова И.С., Валеева Р.Т. Организация производства топливного спирта в Республике Татарстан // Вестник КГТУ. — Казань, 2006. — № 5. — С. 21–26.
 26. Мухачев С.Г., Мельников В.Н., Садыков Р.А. и др. Перспективы комплексной переработки возобновимых ресурсов // Вестник КГТУ. — Казань, 2003. — № 2. — С. 424–430.

IMPROVED MICROBIAL TECHNOLOGIES BASED ON SPECIALIZED AUTOMATION SYSTEMS RESEARCH

S.G. MUKHACHEV, V.M. EMELYANOV, A.S. SIROTKIN, M.V. SHULAEV

Kazan State Technological University

Overview of using their own data. The results of operations for the automation of biotechnological research, development, equipment and intensive industrial processes, biosynthesis, waste management, process improvement of sewage treatment and improve the efficiency of biotechnological industry through an integrated use of raw materials.

Keywords: industrial biotechnology, microbial technology, automation systems research, wastewater treatment.

ПОЛИТИКА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В ОБЛАСТИ НАУК О ЖИЗНИ И ИННОВАЦИОННОЙ БИОЭКОНОМИКИ

А.В. ХЛУНОВ*

*Департамент науки, высоких технологий и образования Правительства Российской Федерации,
Москва*

Представлены материалы о современной государственной политике Российской Федерации в области биотехнологии и наук о жизни в целом. Акцент делается на приоритетной поддержке инновационной биоэкономики.

Ключевые слова: науки о жизни, биотехнология, биоэкономика, инновации, российская государственная политика.

Приоритетное развитие инновационной экономики является главной целью современной России. В связи с этим государственная политика Российской Федерации направлена на постоянную инновационную модернизацию национальной экономики. Это выражается в государственной поддержке науки и технологий в тех областях, где Россия занимает лидирующие позиции, чтобы сохранить конкурентные преимущества и обеспечить национальную безопасность.

В обсуждаемом контексте первоочередную проблему представляет определение приоритетных направлений развития науки и технологий в Российской Федерации, что является непростым мероприятием по причине широкого круга задач, требующих неотложного решения, ограниченных ресурсов национальной экономики, ограниченного потенциала отечественных науки и технологий.

Следующие области инновационного развития Российской Федерации определены в 2009 году как приоритетные:

- энергоэффективность и энергосбережение,
- медицинские технологии.
- ядерные технологии,
- космические технологии,
- стратегические информационные технологии.

Целевые показатели, на которые планируется выйти к 2020 году, выглядят следующим образом — по сравнению с 2007 годом (табл. 1).

Таблица 1

Планируемый рост российской экономики (в %)

Наименование показателя	2007	2020
Доля высоких технологий и биоэкономики, основанной на знаниях	10,9	10–20
Экспортное соотношение российских высокотехнологичных продуктов на международном рынке	0,3	2
Промышленные предприятия, использующие инновации	9,5	40–50
Доля инновационных продуктов	5,5	25–35
Доля России в глобальной экономике	3,2	4,3

В рамках концепции долгосрочного социально-экономического развития России вопросам прогресса биотехнологии уделяется внимание по таким направлениям, как «Стратегия Фарма-2020», нанотехнологии, создание национальной системы химической и биологической безопасности, доктрина пищевой безопасности, применение Федерального закона РФ от 2 августа 2009 г. № 217-ФЗ «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации по вопросам создания бюджетными научными и образовательными учреждениями хозяйствующих обществ в целях практического применения (внедрения) результатов интеллектуальной деятельности» и т.д.

В настоящее время в число российских национальных приоритетов в области науки и технологий включены: информационные и телекоммуникационные системы, индустрия наносистем и материалов, науки о

© 2010 г. Хлунов А.В.

* Автор для переписки:

Хлунов Александр Витальевич
директор Департамента науки, высоких технологий
и образования Правительства Российской Федерации

жизни, устойчивое использование природных ресурсов, энергия и энергосбережение, безопасность и борьба с террористами.

В блок наук о жизни входят следующие критические технологии:

- биокаталитические, биосинтетические и биосенсорные технологии;
- биомедицинские и ветеринарные технологии жизнеобеспечения и защиты человека и животных;
- технологии биоинженерии;
- клеточные технологии;
- геномные и постгеномные технологии создания лекарственных средств.

Важным элементом реализации государственной стратегии России в сфере науки являются федеральные целевые программы (ФЦП):

- «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» (объем финансирования – 3,1 млрд. Евро);
- «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (1,1 млрд. Евро);
- «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008–2010 годы» (0,68 млрд. Евро);
- «Национальная технологическая база» на 2007–2011 годы (0,88 млрд. Евро).

Надо сказать, что XXI столетие становится веком биоэкономики, то есть экономики, основанной на широкомасштабном применении биотехнологий. Это диктуется глобальными вызовами сегодняшнего дня: увеличение народонаселения земного шара, истощение важнейших природных ресурсов, уменьшение биоразнообразия, загрязнение окружающей среды, изменение климата.

Роль биотехнологии является ключевой в таких сферах, как питание увеличивающейся человеческой популяции на Земле, улучшение здравоохранения, снижение эффекта истощения невозобновляемых источников, предотвращение изменений климата и загрязнений окружающей среды.

Согласно прогнозам Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР), к 2030 году на основе биотехнологии будет производиться:

- 35% продукции химической индустрии;
- 80% лекарственных препаратов;
- 50% сельскохозяйственной продукции;
- 2,7% ВВП развитых экономик, причем в развивающихся странах вклад будет даже больше.

Возвращаясь к теме биоэкономики, следует отметить, что она базируется на четырех основополагающих элементах, четырех «И» инновационного развития:

- **Институты** — разработка и внедрение государственных программ по биотехнологии.
- **Инфраструктура** — развитие промышленной биотехнологии: технологические основы биоэкономики.
- **Инновации** — основанные на знаниях, национальных традициях исследований и разработок (НИОКР) и потенциале.
- **Инвестиции** — создание биотехнологических кластеров и привлечение инвесторов.

Говоря о биоэкономике, основанной на знаниях (Knowledge Based BioEconomy — КВВЕ), принято делать акцент на ее главные элементы:

- глубокие знания геномных, постгеномных и клеточных технологий, позволяющих разрабатывать новые процессы для производства ряда продуктов;
- использование возобновляемой биомассы и эффективных экологически чистых биопроцессов для устойчивого получения продукции;
- интеграция методов биотехнологии с различными секторами экономики.

Мир биоэкономики открывает совершенно новые возможности практически во всех отраслях народного хозяйства: химическая промышленность, энергетика, биотопливо, биоматериалы, биоинженерия, производство продуктов питания и кормов.

Каково современное состояние биотехнологии в России? Традиционно, как и в других странах, выделяют три макросектора:

- белую (промышленную) биотехнологию;
- красную (фармацевтическую) биотехнологию;
- зеленую (сельскохозяйственную) биотехнологию.

Объем рынка биотехнологической продукции в Российской Федерации составляет примерно 2 млрд. долл. (с темпами роста — 20%). На рисунке 1 представлено распределение биотехнологических продуктов по сегментам рынка: биофармацевтические препараты — 75%, ферменты — 10%, сельскохозяйственные продукты — 10%, другие — 5%.

Министерство промышленности и торговли РФ разработало концептуальный документ «Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации до 2020 года» («Стратегия Фарма-2020»). Целевые показатели «Стратегии Фарма-2020» приведены на таблице 2.

Кроме развития фармацевтического производства, в России имеются реальные перспективы эффективного

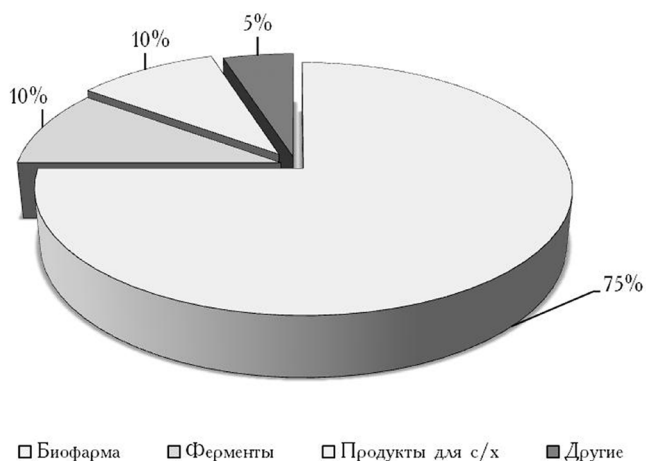


Рис. 1. Соотношение видов продуктов на биотехнологическом рынке в России. *Источник:* компания Abercade

Промышленная биотехнология в целом обеспечивает производство ключевых продуктов — ферментов, диагностикумов, лекарственных препаратов, позволяет утилизировать отходы, обрабатывать сточные воды, осуществлять ремедиацию почвы и другие агrobiологические мероприятия.

Российская биотехнология имеет наибольшие приоритеты в области биофармацевтики, агrobiотехнологии, биоиндустрии. Здесь играют роль и социальная значимость, и государственная поддержка, и другие благоприятные факторы.

Важным инструментом в реализации указанного потенциала, помимо вышеотмеченных ФЦП, служат региональные программы и технологические платформы, созданные в рамках международного сотрудничества.

использования биомассы. Как показывает опыт стран, активно применяющих биотехнологию, переработка биомассы позволяет решить ряд жизненно важных проблем:

- социальная польза: улучшение качества жизни, социальное развитие, рабочие места;
- устойчивое развитие: источник экологически чистой, универсальной (легко трансформируемой) и возобновляемой энергии;
- охрана окружающей среды: уменьшение парниковых газов, предотвращение деградации почв, противодействие изменению климата.

Российская Федерация обладает уникальными природными ресурсами. Так, например, 60% высокопродуктивного чернозема мира находится в России и Украине.

Значительная часть пахотных земель временно выведена из сельскохозяйственного оборота. Имеется также существенный резерв повышения урожайности (к 2015 году — увеличение на 35 млн. т зерна).

В отношении лесных запасов ситуация такова. Российская Федерация здесь имеет следующие показатели: в ней 20% мировых лесных ресурсов, 50% хвойных лесов, 60% северных (арктических) лесов. Наличие таких ресурсов открывает возможности для создания сети производств по глубокой переработке древесины. Отечественные специалисты обладают оригинальными технологиями безотходной высококачественной переработки лигноцеллюлозного сырья.

Кроме того, существуют типовые проекты био-заводов («biorefineries»), на которых можно проводить полные циклы биотехнологической переработки биомассы с выходом продуктов в разные сегменты биоиндустрии.

Таблица 2

Целевые показатели «Стратегии Фарма-2020»

Наименование показателя	2007	2020
Общий объем продаж, млрд. долл.	11	30
Доля отечественных препаратов на рынке, %	20	50
Доля российских инновационных фармацевтических препаратов, %	5	30
Число российских инновационных фармацевтических препаратов	5–10	> 200
Национальная лекарственная безопасность	Нет	Да

Первой принятой региональной программой по биотехнологии является целевая программа «Развитие биотехнологии в Республике Татарстан на 2010–2020 годы», в которой ставятся реальные задачи ускоренного развития биотехнологии в Республике. Разрабатываются соответствующие программы в Чувашской Республике, Кировской области, Москве и Московской области, Новосибирской области.

Что касается указанных технологических платформ, то они осуществляются под эгидой 7-й рамочной программы ЕС. В настоящее время разрабатываются направления: промышленная биотехнология, здоровье, лесная биотехнология, растения для будущего, здоровье животных, пищевая безопасность, рыбководство и аквакультуры.

Правительство Российской Федерации всемерно поддерживает и координирует в государственном мас-

штабе развитие биотехнологии. К числу очередных актуальных мероприятий относится создание национальных технологических платформ с последующим формированием долгосрочной программы развития промышленной биотехнологии, к чему будут привлечены профильные министерства и ведомства, НИИ, бизнес-структуры, ведущие специалисты.

Необходимо привести перечень организаций, занимающихся разработкой проблем развития биотехнологии в Российской Федерации. Среди них: Пушинский научный центр РАН, МГУ им. М.В.

Ломоносова, РНЦ «Курчатовский институт», Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, ГосНИИгенетика, Центр «Биоинженерия» РАН, Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Союз предприятий биотехнологической отрасли, Российская биотопливная ассоциация, ОАО «Корпорация Биотехнологии», ОАО «Росалко», профильные малые и средние предприятия.

Материалы доклада на II Международном конгрессе «ЕвразияБио-2010» (Москва, 12–15 апреля 2010 г.)

THE POLICY OF THE RUSSIAN FEDERATION IN THE FIELD OF LIFE SCIENCES AND INNOVATIVE BIOECONOMY

A.V. KHLUNOV

Department of science, high technology and education of the Government of the Russian Federation, Moscow

The materials of the modern public policy of the Russian Federation in the field of biotechnology and life sciences in general. Emphasis is placed on a priority support innovation bioeconomy.

Keywords: life sciences, biotechnology, bioeconomy, innovation, the Russian state policy.

ОТ СИСТЕМНОЙ БИОЛОГИИ К МЕДИЦИНЕ P4 (PREDICTIVE, PERSONALIZED, PREVENTIVE, PARTICIPATORY)

ЛЕРОЙ ХУД*

Институт системной биологии, Сиэтл, США

Представлен обзор современных данных о медицине P4 (Predictive, Personalized, Preventive, Participatory). Анализируются исходные данные системной биологии, которые могут стать фундаментальной основой указанной медицины будущего.

Ключевые слова: системная биология, медицина P4.

Медицина XXI века приобрела качественно новый уровень. Она вобрала в себя лучший опыт предыдущих столетий и включила в себя достижения последних лет в сфере науки и техники, а также сопредельных специальностей (биологии и т.д.).

Мне удалось участвовать в формировании четырех парадигм, изменивших биологию и приведших к созданию так называемой медицины P4. К этим парадигмам относятся:

- внедрение инженерии в биологию (высокопроизводительная биология);
- реализация проекта «Геном человека»;
- междисциплинарная биология;
- системная биология.

Работа проводится в Институте системной биологии.

Медицина P4 означает собой медицину, основанную на четырех механизмах:

- Predictive — «Предсказательная»;
- Personalized — «Профилактическая»;
- Preventive — «Персонализированная»;
- Participatory — «Совместная, в том числе с участием пациентов».

Следует отметить, что каждый существенный этап развития встречается со скепсисом. Кроме того, каждый фундаментальный шаг меняет представления о биологии и медицине. Наконец, каждая новая идея требует создания новой организационной структуры.

Биология будет доминирующей наукой XXI столетия, потому что она может решить проблему сложности. Сложность — это научная проблема для многих научных дисциплин XXI века: физики, химии, геологии, инженерии, биологии и т.д. Новые концепции, стратегии и технологии позволяют биологии успешно приступить к решению проблемы сложности, поскольку биология является информационной наукой. Системный подход позволяет эффективно изучать сложность, старые и новые технологии дают возможность исследовать новые (и старые) области знаний, компьютерные и математические методы позволяют приобретать, накапливать, передавать, интегрировать, копировать и создавать предсказуемые модели.

Такие подходы будут обеспечивать эффективное решение самых насущных проблем общества — здравоохранение, здоровье населения мира, экология, энергетика, питание, сельское хозяйство и др.

Современная системная биология рассматривается как информационная наука. Два типа биологической информации обуславливают биологию и медицину:

- компьютерная информация о геноме;
- информация об окружающей среде, которая влияет и модифицирует компьютерную информацию.

Существуют две главные биологические структуры, которые обращаются с информацией:

1. Биологические сети, которые получают, превращают, обрабатывают и передают информацию:
 - белковые сети;
 - генетические регуляторные сети;
 - микроРНК сети;
 - генетические сети.
2. Простые и сложные молекулярные сети, осуществляющие биологические функции.

В биологии принято выделять следующие уровни регуляции: ДНК — мРНК — белок — белковые взаимодействия и биомодули, белок и генные сети — клетки — фенотипы — органы — организмы — популяции — экосистемы.

Необходимо остановиться на общих принципах системной биологии. Фундаментальные основы системной биологии включают в себя нижеперечисленные элементы:

- формирование гипотезы и имитационное моделирование;
- сбор и анализ данных (общий анализ, обобщение многопараметрических типов данных, динамический анализ, отсев шумов и сигналов);
- прогнозируемые и действующие модели (описательные, графические или математические).

Функциональная схема системного подхода представлена на рисунке 1.

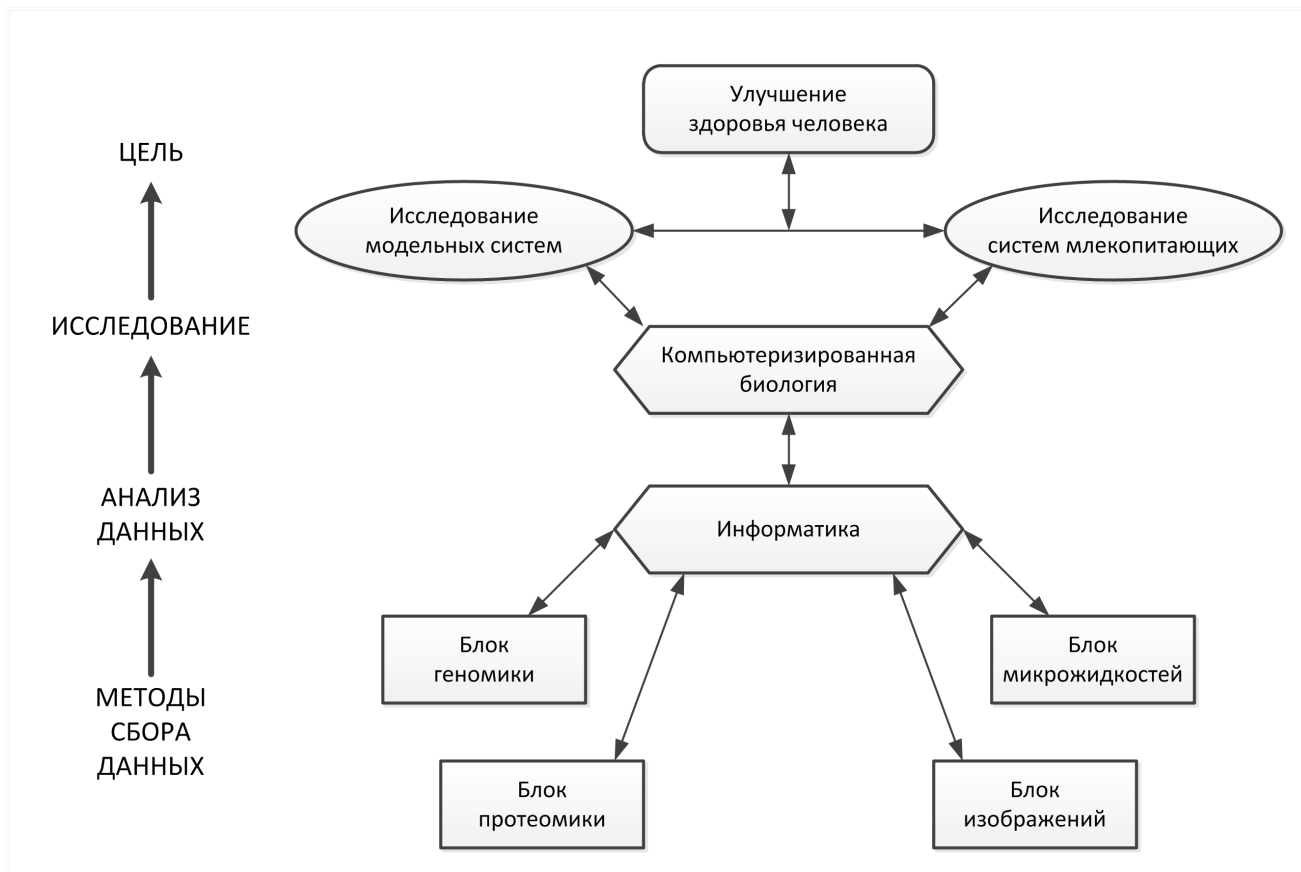


Рис. 1. Общая схема системного подхода в биологии

Указанную общую методологию системной биологии важно проанализировать на примере различных заболеваний. Вначале целесообразно остановиться на примере прионных заболеваний (речь пойдет о результатах, полученных на мышах).

Был осуществлен общий транскриптомный анализ у разных линий мышей: C57Bl/6J, FVB/NCr, BL6.l, FVB/B4053 и др. Исследованы различные прионные линии (RML, 301V и т.д.). Анализировали РНК из гомогенатов мозга мышей. Объем информации — 50 Мбайт.

Были изучены нейропатологические особенности: дегенерация синапсов, гибель нервных клеток, активация

микроглии и астроцитов, накопление прионного белка PrP.

Полученные данные позволили сделать шесть обобщающих выводов:

- проведен транскриптомный анализ у 8 линий мышей с прионными заболеваниями (в различные сроки);
- установлена корреляция с данными белковых взаимодействий, выявленных с помощью анализа гистопатологических результатов (сетевой анализ заболевания);
- установлена корреляция с динамическими гистопатологическими исследованиями;
- установлена корреляция с клиническими симптомами;

- изучено распределение инфекционного прионного белка в мозгу в процессе развития заболевания;

- исследованы изменения концентрации мозгоспецифического белка крови.

Уникальные возможности открывает анализ накопления белка РgР и репликационной сети в динамике развития прионного заболевания — 6 нед. и 20 нед. (рис. 2, 3, соответственно).

Важным показателем являются дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ). Так, 231/333 ДЭГ кодируют известные патогенные сети заболевания, 102/333 ДЭГ кодируют новые патогенные сети. Эти вызванные заболеванием активируются последовательно. В связи с упомянутым ставится задача восстановления генерированных заболеваниями сетей с помощью ориентированных на мишень лекарственных препаратов. Указанное открывает возможности также для диагностики.

Определение 15 мозгоспецифических белков крови может служить надежным индикатором времени активации сетей, нарушенных прионным заболеванием, то есть фактически является инструментом интегральной диагностики, одним из базовых элементов медицины Р4.

Технологии системной биологии в сущности трансформируют современную медицину, революционизируют ее. Вот некоторые точки ее приложения к медицине:

- новые стратегии секвенирования генома в семье;
- новые приложения масс-спектропии;
- компьютерная протеомика;
- общий SPR-анализ;
- чипы белков микрожидкостей;
- белок-захватывающие агенты;
- анализ отдельных белков;
- анализ отдельных клеток.

Секвенирование полного генома семьи дает возможность диагностировать у детей краниофациальный порок развития (постаксиальный акрофациальный дизостоз, или синдром Миллера) и заболевание легких (цилиарную дискинезию). Снижение шумов при таком секвенировании позволяет:

- идентифицировать 70% ошибок секвенирования с использованием менделевского наследования — частота выявления ошибок $\approx 1/100000$;
- открытие ≈ 230000 новых SNP — 4,2 млн. SNP на семью;
- первые полные высокоразрешающие карты комбинации семьи;
- определение процента мутаций между поколениями;

- идентификация генов-кандидатов, определяющих редкие генетические заболевания.

ДНК получают из лимфоцитов крови, объем информации — 120 Гбайт/геном. При широкомасштабном исследовании геномов человека требуется хранение информации объемом — 20 Тбайт.

Значительное место в медицине будущего занимает протеомика. В настоящее время разработаны устройства для анализа 100–200 белков в час с помощью метода Multiple Reaction Monitoring (MRM-MS). Ставится задача создания MRM-протеомного атласа человека, для чего потребуются установки для одновременного анализа 20 тыс. белков.

Открывается перспектива с помощью чипов определять в капле крови 2500 органоспецифических белков плазмы.

Имеются технологии перемещения антител. При этом используются пептидные захватывающие белок агенты.

Каковы прогнозы на будущее, связанные с активным внедрением системной биологии в медицинскую практику? Здесь в ближайшие 2–10 лет ожидается реализация девяти перспективных направлений.

1. Секвенирование полного генома индивида — для прогноза здоровья и секвенирования семьи.
2. Секвенирование генома отдельной клетки — диагностика рака.
3. Полное секвенирование хромосомного главного комплекса гистосовместимости (МНС) в семьях — диагностика аутоиммунных заболеваний и аллергии.
4. Функционирующие SNP — гены, связанные с фармакогенетикой и заболеваниями.
5. Секвенирование одновременно 1000 транскриптомов при секвенировании одной ДНК, взятой из отдельных раковых клеток или отдельных клеток при биопсии — для диагностики заболевания.
6. Определение 2500 органоспецифических белков крови — дважды в год (50 белков из 50 органов) — оценка здоровья.
7. Набор из 13000 белков человека — против аутоиммунных или аллергических сывороток (для диагностики).
8. Анализ 10000 В клеток и 10000 Т клеток из функциональных областей их иммунных рецепторов — прошлое и настоящее иммунных ответов, после вакцинаций, идентификация аутоиммунных антител.
9. Анализ отдельных стволовых клеток от каждого индивидуума, дифференцированных в соответствующих тканях, чтобы получить важную фенотипическую инфор-

мацию — молекулярный, структурный и высший уровень фенотипических измерений.

Осуществление указанных мероприятий и реализация концепции системной биологии в целом в конечном итоге может привести к созданию медицины P4 в ближайшие 10–20 лет.

Поэлементно медицина P4 обеспечит выход на следующие показатели:

- **Предсказательная медицина** создает вероятностный прогноз здоровья (по ДНК-последовательности); мультипараметрическое измерение белков крови два раза в год; *in vivo* определение («визуализация») молекул.

- **Персонализированная медицина** предоставляет уникальный генетический паспорт для индивидуального лечения; обеспечивает длительный контроль пациента; по каждому индивидуальная информация — гигабайты информации, общая информация на 100 млн. пациентов с гигабайтами индивидуальной информации.

- **Профилактическая медицина** позволяет определять дизайн лечебных и профилактических препаратов с помощью системного подхода; системный подход к вакцинам служит для предотвращения инфекционных заболеваний; при этом обеспечивается оценка состояния здоровья.

- **Совместная медицина, в том числе с участием пациента («participatory»)**, дает возможность больному участвовать в процессе лечения; это требует переобучения врачей, сформировавшихся до появления медицины P4; медицинское сообщество взаимосвязано и руководствуется едиными образовательными программами; информационные технологии в здравоохранении позволяют обслуживать миллиарды пациентов (объем информации у каждого — гигабайты).

Есть еще немаловажное обстоятельство — медицина P4 коренным образом трансформирует индустрию здравоохранения во всех ее областях: фармацевтика, биотехнология, диагностика, медицинские информационные технологии и др.

Информатизация биологии и медицины будет преобразовывать медицину, что позволит анализировать отдельные молекулы, отдельные клетки, отдельных индивидов, снизить стоимость медицинских услуг.

Для перехода к медицине P4 потребуется проведение пилотных экспериментов. Один из них предполагается в рамках стратегического партнерства Института системной биологии провести в Люксембурге. Будет создан Центр системной медицины, где будут реализованы два исследовательских проекта (финансирование — 100 млн. долл. в течение 5 лет). Другой пилотный проект будет выполняться с медицинским факультетом Университета Огайо: в нем будет задействовано население 55 тыс. человек.

Таким образом, заключая настоящее сообщение, можно сделать шесть выводов о медицине P4.

1. Медицина P4 является медициной настоящего и будущего.

2. Медицина P4 является скорее революционной, чем эволюционной, поскольку медицина становится информационной наукой. Будут созданы базы данных с миллиардами байт на каждого индивидуума.

3. Медицина P4 будет преобразовывать медицинскую промышленность.

4. Медицина P4 будет эффективной и недорогой.

5. Необходима реализация пилотных проектов на людях с информационной поддержкой, чтобы убедить скептиков.

6. Руководителей Национальной системы здравоохранения США нужно склонить к признанию факта, что медицина P4 перспективнее прежней обычной реактивной медицины.

Материалы доклада на II Международном конгрессе «ЕвразияБио-2010» (Москва, 12–15 апреля 2010 г.)

FROM SYSTEMS BIOLOGY TO P4 MEDICINE (PREDICTIVE, PERSONALIZED, PREVENTIVE, PARTICIPATORY)

LEROY HOOD

Institute of Systems Biology, Seattle, USA

A review of recent data on medical P4 (Predictive, Personalized, Preventive, Participatory). Analyzed baseline data of systems biology, which may be the fundamental basis of this medicine of the future.

Keywords: systems biology, medicine P4.

МИРОВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ: УЛУЧШЕНИЕ КАЧЕСТВА ЖИЗНИ, СОЦИАЛЬНОЙ СРЕДЫ И НАЦИОНАЛЬНЫХ ЭКОНОМИК

СТИВЕН БЕРРИЛЛ*

Беррилл и Ко., Сан Франциско, Калифорния, США

В обзорном докладе обобщены современные данные о биотехнологических основах фармацевтики, медицины, сельского хозяйства, энергетики. Акцент делается на анализ вопросов экономики и управления.

Ключевые слова: биотехнология, менеджмент, маркетинг.

Я благодарен за приглашение выступить на этом авторитетном биотехнологическом форуме. В своем докладе я остановлюсь на трех вопросах: 1) что происходит в современном мире; 2) где имеются наибольшие возможности; 3) какое значение это имеет для Москвы, России, Евразии.

Самыми актуальными проблемами современного мира (исключая терроризм) являются:

- глобальное изменение климата, устойчивость планеты;
- чистая вода;
- энергетическая безопасность, энергетическая самодостаточность;
- безопасность пищи и производство продуктов питания;
- здравоохранение и реформа здравоохранения.

И все эти проблемы может решить или взяться за них биотехнология.

Нынешняя ситуация в мире характеризуется уменьшением рынка капитала и реструктуризацией финансовых структур промышленности, глобальным экономическим кризисом, сохранением блокбастерной модели фарминдустрии и ее перестройкой, возрастанием конкуренции с новыми рынками (страны БРИК или MENA – Middle East and North Africa – Ближнего Востока и Северной Африки) традиционных рынков (США, Европа, Япония), реформированием здравоохранения и т.д.

Существуют различные прогнозы выхода из кризиса — от пессимистических (замедление роста) до оптимистических (возврат к докризисному состоянию или продолжение роста).

Рассмотрим составные части процесса уменьшения рынков капитала. Прежде всего, отмечается реструктуризация этих рынков:

- снижение покупательского спроса, постоянная реструктуризация торгующих сторон, появление новых фирм;
- доступность капитала: ресурсы фондов (менее 1 млрд. долл.) резко уменьшились, трудно найти капитал;
- неактивная стратегия крупных фармкомпаний (интерес больше смещается к дженерикам и др.).

Таким образом, существующее положение ставит вопрос об оптимизации, креативности финансирования.

В последние годы констатируется значительная потеря рыночного капитала крупными фармацевтическими компаниями (рис. 1).

На рисунке 1 видно, что у некоторых фирм это снижение до двух раз и более. В целом сумма финансовых потерь за 10 лет составляет более 500 млрд. долл.

Очень интересны цифры расхода средств на лекарственные препараты, приходящиеся на душу населения (табл. 1). Эти данные важны для организации здравоохранения в приведенных в этой таблице странах, в том числе и в контексте реформы здравоохранения США, намечаемой президентом Бараком Обамой.

Сегодняшнее состояние развития научной медицины характеризуется внедрением новейших технологий, включая молекулярный уровень, а также так называемые конвергентные технологии (биотехнология, системная и синтетическая биология, нанотехнология, новые материалы, последние достижения компьютерных технологий и др.).

© 2010 г. Стивен Беррилл

* **Автор для переписки:**

G. Steven Burrill

Dr., Chief Executive Officer,

Burrill & Company,

San Francisco, CA 94111, USA

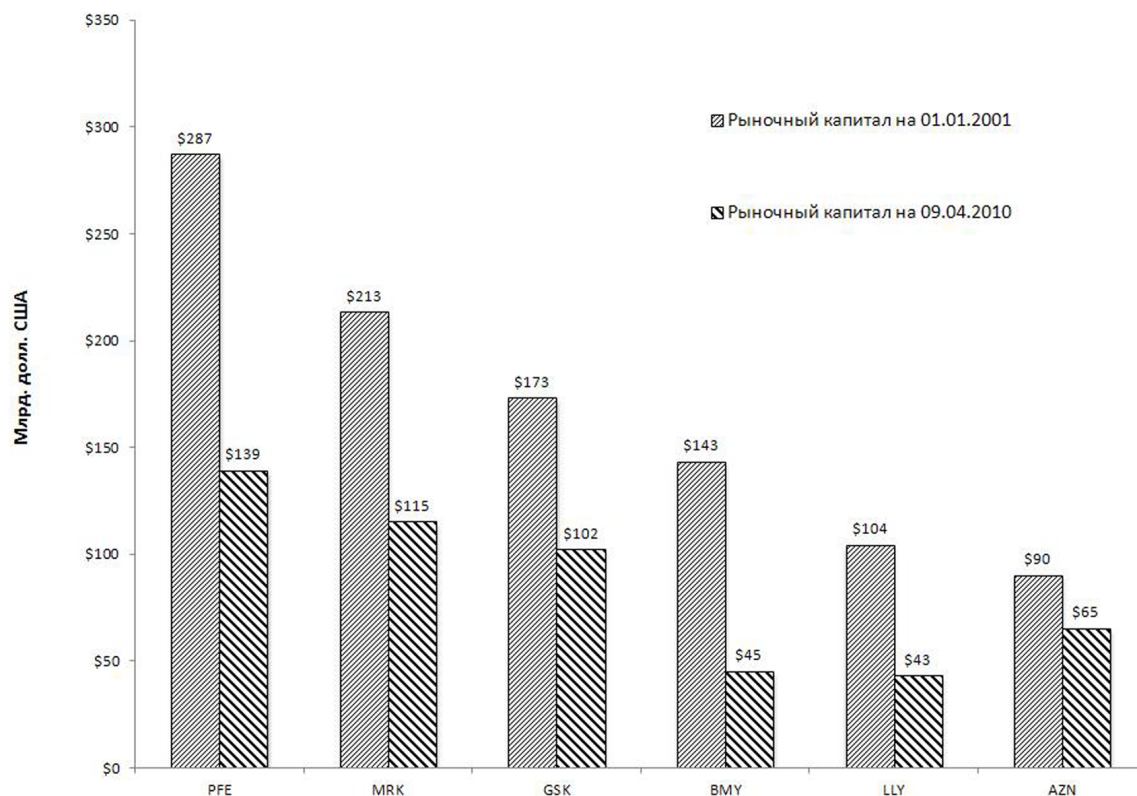


Рис. 1. Динамика рыночного капитала ведущих фармкомпаний за последние 10 лет.
 Обозначения: PFE – Pfizer, Inc.; BMY – Bristol-Myers Squibb Co.; LLY – Eli Lilly & Co.;
 AZN – AstraZeneca plc; MRK – Merck & Co., Inc., GSK – GlaxoSmithKline plc.
 Источник: Bloomberg

Таблица 1

Расход средств на лекарства на душу населения (в долл. США)

Годы	Страны						
	Китай	Россия	Соединенное Королевство	Германия	Япония	Франция	США
2004	12,2	38,7	321,1	502,8	570,7	606,0	871,9
2008	27,6	119,9	348,7	681,0	672,6	784,0	1018,2

Источник: Business Monitor International

Сейчас уже принято говорить о наступлении эры персонализированной медицины. Молекулярный уровень ведет к построению рациональной терапии, дающей возможность интегрировать вопросы диагностики, назначения лекарств, оформления идентификационных документов, выполнения требований FDA в отношении NDA/BLA (New Drug Applications/Biological License Applications).

Параллельно с разработкой научных основ молекулярной медицины идет развитие ее производственной и технологической базы. В геномике речь идет о сложных установках, в протеомике — о новых тестирующих

устройствах, в иммунодиагностике — о приборах с новыми алгоритмами. В США в 2008–2009 гг. был зарегистрирован ряд таких высокотехнологичных устройств: In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assays (IVDMIA), Quality, Regulation and Clinical Utility of Laboratory Developed Tests и др.

Новое направление стимулирует образование консорциумов и объединений фирм.

Следует указать на то, что настоящий бум переживает вся система диагностики современной медицины. Помимо упомянутых молекулярных подходов, сейчас внедряются сенсоры, дистанционный мониторинг жиз-

ненно важных показателей организма в режиме реального времени.

Конечно, большую роль в настоящее время играют уже широко применяемые элементы персонализированной медицины: ориентированная на мишень (таргетная) терапия, индивидуализированное лечение, персональный уход.

Однако медицина-2020 нацеливается на более высокие рубежи. Здесь ожидается использование принципиально новых подходов к диагностике, лечению, профилактике. Проанализируем некоторые из них.

Войдут в повсеместное употребление портативные приборы для определения уровня холестерина, глюкозы и т.д., смартфоны и другие мобильные устройства создадут условия для универсальной телемедицины (передача телеизображений и др.), будут внедряться автоматизированные устройства контроля приема лекарств и т.д.

Здравоохранение-2020 имеет три главные цели:

1. Переход от односторонности к 3–4 «Р»:
 - «**Personalization**» — «Персонализация»;
 - «**Prediction**» — «Предсказание»;
 - «**Prevention/disease preemption**» — «Профилактика/предотвращение болезни»;
 - «**Patient Responsibility**» — «Ответственность пациента».

2. Переход от доктрины лечения болезни к сохранению состояния здоровья.

3. Увеличение продолжительности жизни (от 60 к 80 годам, от 80 к 100).

Необходимо иметь в виду, что новые молекулярно-биологические методы, внедряемые в медицинскую практику, имеют высокую стоимость. Так, например, стоимость секвенирования полного генома человека еще недавно составляла десятки тысяч долларов, однако имеется реальная возможность выхода в ближайшее время на уровень порядка 1000 долл., то есть приблизиться к стоимости традиционных генетических тестов (на миодистрофию Дюшенна, болезнь Шарко–Мари–Тута и др.).

Такая тенденция позволит обеспечить раннюю диагностику наследственных заболеваний (их более 6000, часть из них излечима), определять наследственную предрасположенность к приобретенным болезням, осуществлять раннюю диагностику приобретенных заболеваний, особенно рака. Следовательно, здесь по существу реализуется стратегия профилактики, упреждения наступления заболевания или его диагностики на ранних стадиях, нередко поддающихся лечению.

В целом современное здравоохранение характеризуется интеграцией технологий (рис. 2).



Рис. 2. Интеграция технологий в медицине.

Источник: Burrill and Co

В наше время большое внимание уделяется прогнозам. В отношении фармацевтического рынка имеется прогностический анализ, в котором проведено сравнение долей разных стран. На долю Северной Америки приходится 41%, Европы — 27%, развивающихся рынков — 13%, Японии — 11%, всех остальных стран — 8%. Интересный прогноз дан для стран развивающихся рынков на период 2008—2013 гг. (рис. 3).

Существует адаптивная специализация фармацевтических компаний. Так, например, Teva — мировой

лидер по производству дженериков для терапии; Life Technologies (Invitrogen/AB1) производит диагностикумы; Sanofi-Aventis — препараты для животноводства, дженерики для развивающихся рынков; Novartis — препараты для офтальмологии и ухода за глазами (Alcon), потребительские продукты; Roche — Genentech обеспечивает расширение портфеля продукции; Pfizer/Wyeth производит биопрепараты (включая стволовые клетки) и вакцины; Pfizer/Strides Arcolab — дженерики в Индии и т.д.

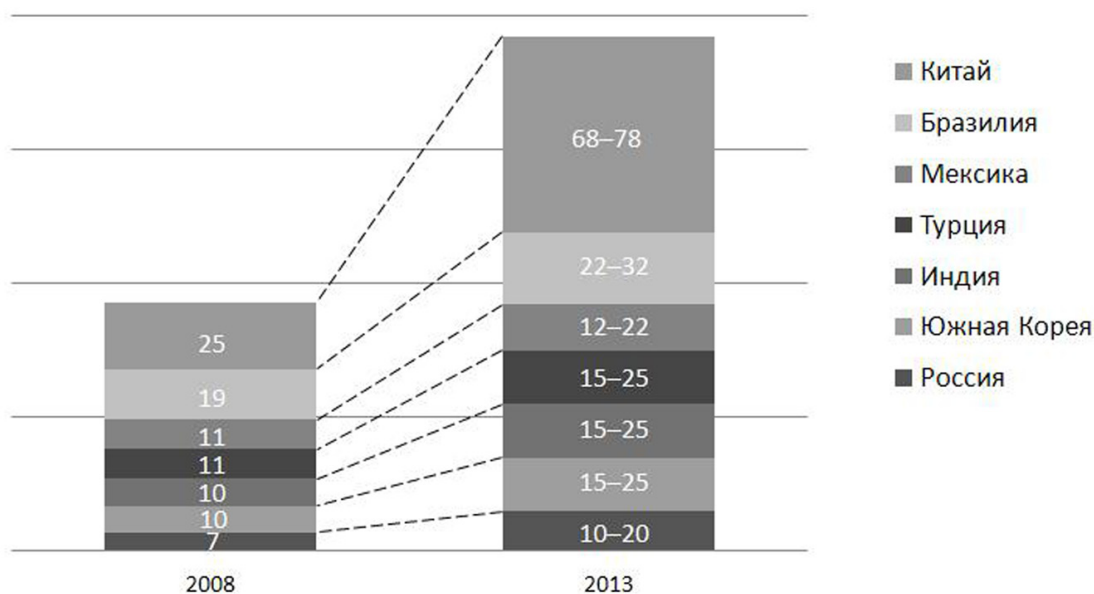


Рис. 3. Сектор развивающихся рынков глобального фармацевтического рынка (прогноз)
 Замечание: прогноз для России на 2013 год основан на прогнозе сентября 2008 г.
 Источник: IMS Health, Market Prognosis

Констатируется общая тенденция к производству дженериков. Например, в США сейчас 76% Rx препаратов представляют собой дженерики. Это объясняется тем, что главные блокбастеры выходят из срока патентной защиты, растут развивающиеся рынки и др.

Ныне отмечается увеличение рынка медицинских услуг в мире. Такое положение обусловлено ростом народонаселения земного шара, появлением новых рынков (Латинская Америка, Средний Восток, Южная Африка и др.), увеличением популяций на евразийском пространстве (Россия, Китай, Индия), расширением слоя среднего класса, повышением спроса на высококачественное медицинское обслуживание, увеличением срока ухода за хроническими больными (постинсультными, онкологическими, после травмы и др.).

К 2020 году процессы глобализации будут все больше нарастать: смещение рынков в Азию и развивающиеся страны, увеличение объема научно-исследовательских работ в Азии, всеобщая информатизация, глобализация компаний и др. Не будет излишней в этом аспекте информация о сравнительной стоимости клинических испытаний лекарственных препаратов в разных государствах. Согласно данным SalaryExpert.com; WDI Database; Economical Intelligence Unit; CBRE Global Markets Rent 2005; A.T. Keamey analysis, Aug 2005; Clinical Trial Offshoring, стоимость клинических испытаний в России в 4 раза ниже, чем в самой дорогой стране — Германии, в 2,5 раза ниже, чем в США и Соединенном Королевстве, и сопоставима с таковой других стран БРИК (Китай, Индия, Бразилия), а также Аргентиной.

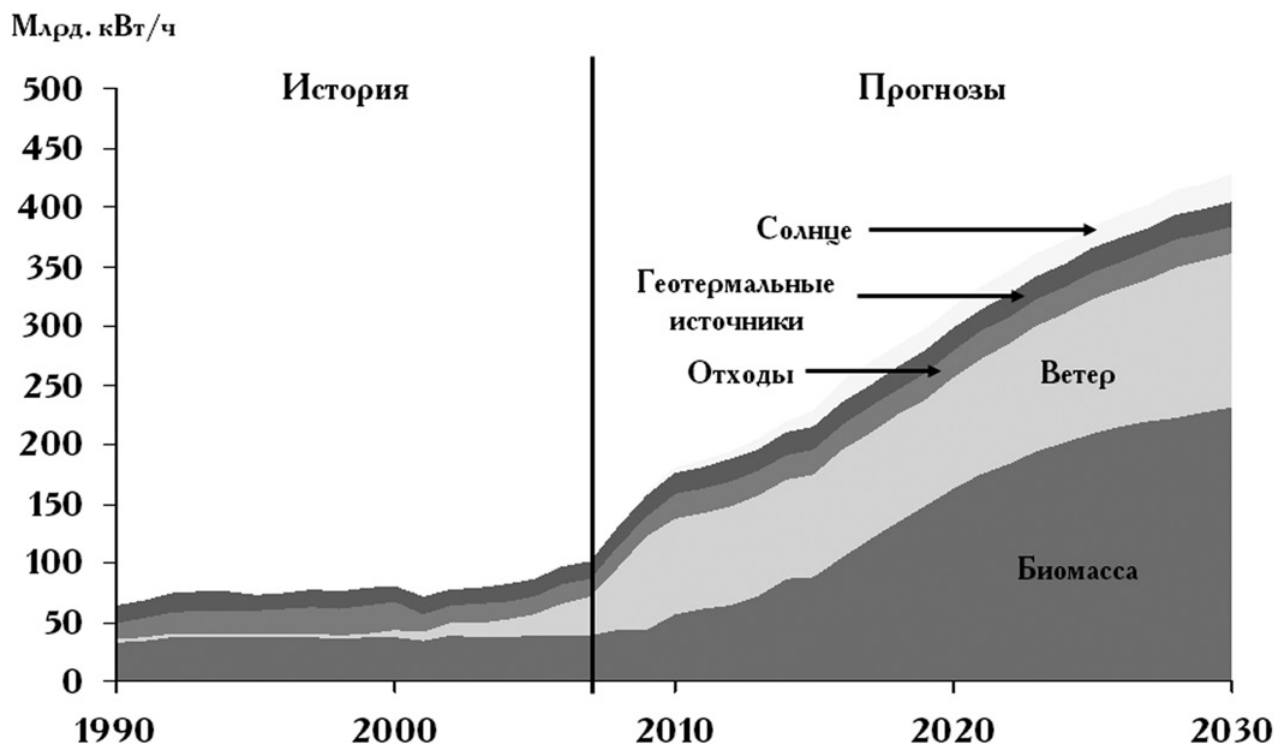


Рис. 4. Биомасса — основной источник энергии будущего

Источник: EIA Annual Energy Outlook 2009 Reference Case Presentation — December 17, 2008

Вышеперечисленные достижения в медицине и фармацевтике главным образом обязаны широкому использованию биотехнологии. Кроме инициатив ведущих частных компаний, большое значение имеет государственная поддержка биоиндустрии. Среди таких стран — Россия, Австрия, Новая Зеландия, Канада, Китай, страны Восточной Европы, ЕС (Германия, Италия, скандинавские страны, Испания, Швейцария, Великобритания), Индия, Израиль, Япония, Корея, Латинская Америка (Бразилия, Чили, Аргентина), Малайзия, Сингапур, Кувейт, Саудовская Аравия и др.

Остановлюсь на зеленой биотехнологии. Она обеспечивает повышенную урожайность растений в экологически чистых условиях, ГМО решают многие вопросы обеспечения питанием и кормами, конверсия биомассы дает сырье для производства биотоплива и продуктов и др. Возникшая дискуссия об альтернативной диаде «пища — топливо» пока еще не закончена. Имеются данные СВО (Congressional Budget Office) о том, что только 10–15% повышения цены на продукты питания обусловлены производством биоэтанола из зерна в 2007–2008 гг. Что касается генно-модифицированных растений, то в 2009 году в 25 странах ими было засеяно 134 млн. га.

Биоиндустрия открывает большие возможности для производства из биомассы жизненно необходимых продуктов: химических препаратов, биополимеров, биотоплива и др., что обеспечивает экономический рост сельского хозяйства и приносит многомиллиардные доходы. В будущем биомасса вместе с другими неминеральными источниками энергии (солнце, ветер, геотермальные источники) будет вносить решающий вклад в энергообеспечение. Особенно перспективно внедрение биоэтаноловых («biorefineries»), которые обеспечивают полную переработку биомассы.

На рисунке 4 представлен прогноз к 2030 году по соотношению негидроэнергетических возобновляемых источников. Видно, что биомасса и ветер будут давать наибольший прирост энергии между 2007 и 2030 гг.: ветер обеспечит 300%-ное увеличение, а биомасса — более чем 500%. При этом достаточно велика и их доля в общей выработке энергии из возобновляемых источников. Что касается солнечной энергии, то она даст в этот период прирост в 1700%, однако ее доля в 2030 году будет составлять всего лишь 0,4% от общей выработки. В целом делается вывод, что негидроэнергетические возобновляемые источники в 2007–2030 гг. будут вносить вклад в объеме 33% в прирост общей выработки энергии.

Надо указать на то, что внедрение биотехнологических производств несет определенные риски. Поэтому данный вид бизнеса требует выполнения определенных технологических, регуляторных, финансовых правил, чтобы быть успешным. К их числу относятся: всесторонняя оценка рынка: мелким компаниям следует избирать его узкие сектора, крупным — координировать деятельность с лидирующими компаниями; надо создавать эффективные механизмы финансирования в соответствии с принципами менеджмента и маркетинга.

В заключение мне хотелось бы изложить собственное видение (прогноз) перспективы развития обсуждаемого направления с позиций 2010 года. Наиболее важные события в будущем выглядят примерно так:

- дальнейший прогресс науки, методов, технологий;
- расширение геномных исследований, снижение стоимости секвенирования до 1000 долл.;
- использование стволовых клеток;
- развитие медицины Р4;
- широкое внедрение вакцин;
- интернационализация регуляторных процессов;

- совершенствование производства препаратов;
- рост производства дженериков;
- изменения в ценах и оплате медицинских услуг;
- увеличение глобального рынка с включением России, Китая, Индии, Бразилии (и всей Латинской Америки), MENA;
- консолидация биофармацевтических компаний с переходом от вертикальной интеграции к сетевому принципу;
- улучшение финансовых механизмов;
- прогресс медицинской информатизации.

Заканчивая выступление, приведу слова Чарльза Дарвина: «Выживает не самый сильный вид, не самый умный, а наиболее приспособленный к изменениям».

Это хорошо подходит ко всем временам, и XXI век не является исключением.

Материалы доклада на II Международном конгрессе «ЕвразияБио-2010» (Москва, 12–15 апреля 2010 г.)

BIOTECHNOLOGY WORLDWIDE: IMPROVING HUMAN LIFE, SOCIAL ENVIRONMENT AND NATIONAL ECONOMICS

G. STEVEN BURRILL

Burrill & Co., San Francisco, California, USA

In the overview report summarizes the current data on the basis of biotechnological pharmaceuticals, medicine, agriculture and energy. The emphasis is on analysis of the economics and management.

Keywords: biotechnology, management, marketing.

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2010 ГОДА*

СОБЫТИЯ

К 100-летию открытия структурных основ хромосомной теории наследственности



В 1910 году вышли работы Т.Х. Моргана, выполненные на дрозофиле, в которых впервые доказывалось, что гены представляют собой дискретные материальные структуры, локализованные в половой хромосоме. Наиболее цитируемой статьёй 1910 г. была публикация в журнале «Science» (Morgan T.H. Sex-limited inheritance in *Drosophila*. Science. 1910. Vol. 32. P. 120–122).

В ней автор сообщил о разработанном им методе количественного анализа передачи наследственных признаков на уникальном объекте — плодовой мушке (*Drosophila melanogaster*). У этого быстро размножающегося животного четыре пары хромосом, что облегчало анализ. Было установлено, что гены локализованы в хромосомах: их сотни и расположены они в виде ожерелья. Величина линейного расстояния между генами характеризует степень сцепления генов. Очень важным фактом было обнаружение гнездового расположения генов, что позволяло передавать следующим поколениям качества в совокупности (разный цвет глаз, неодинаковое число щетинок, варьирующие величина и форма крыльев, окрас туловища и т.д.).

Начиная с этого времени, в течение десятилетия вышла целенаправленная серия работ выдающегося аме-

риканского генетика, создавшего структурные основы хромосомной теории наследственности: в 1910 г. — 3 работы, в 1911 г. — 7, в 1912 г. — 8, в 1913 г. — 2, в 1914 г. — 7, в 1915 г. — 4, в 1916 г. — 1, в 1917 г. — 2, в 1918 г. — 3, в 1919 г. — 2. Параллельно выходили статьи его учеников с базовыми фактами новой теории: в 1913 году — работа А. Стертеванта о кроссинговере, в 1913 и 1916 гг. — публикации К. Бриджеса о нерасхождении половых хромосом и др. В 1915 г. вышла в свет обобщающая книга Т.Х. Моргана, А. Стертеванта, К. Бриджеса и Г. Меллера «Механизмы менделевской наследственности». Наконец, в 1919 году была напечатана итоговая монография Т.Х. Моргана «The physical basis of heredity» (в русском переводе вышла в свет в 1924 г. под названием «Структурные основы наследственности»), в которой анализировался новый, «дрозофильный» этап развития генетики.

Одним из существенных разделов вновь создаваемой теории наследования было представление о линейном расположении генов. Согласно этому, гены каждой группы сцепления выстраиваются в жестко детерминированный неравномерный линейный ряд, названный генетической картой хромосом. Чем больше расстояние между двумя генами, тем больше вероятность разрыва этой последовательной нити, и наоборот, близко расположенные гены более устойчивы в линейном ряду.

«Линейная теория гена» своей ясностью и однозначностью легко воспринималась современниками и представителями следующих поколений ученых. Правда, был ряд исследователей (в том числе Castle W.E., напечатавший статью «Is the arrangement of the genes in the chromosome linear?» в Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1919. Vol. 5. No 2), который подвергал критике концепцию линейного расположения генов. Причем, возражения обосновывались собственными расчетами на генетических картах Моргана с соавторами. Однако такие контраргументы были отвергнуты всем циклом работ лаборатории Т.Х. Моргана.

Сам Морган в книге «Структурные основы наследственности» (1924) высказывается на этот счет вполне определенно: «Факт линейного расположения генов устанавливается изучением явления сцепления и сопряженного с ним процесса кроссинговера» (гл. IX, стр. 110). Он считал, что этих фактов достаточно для доказательства принципа линейности. Хотя Морган и

* Материал подготовлен О.В. Воробьевой

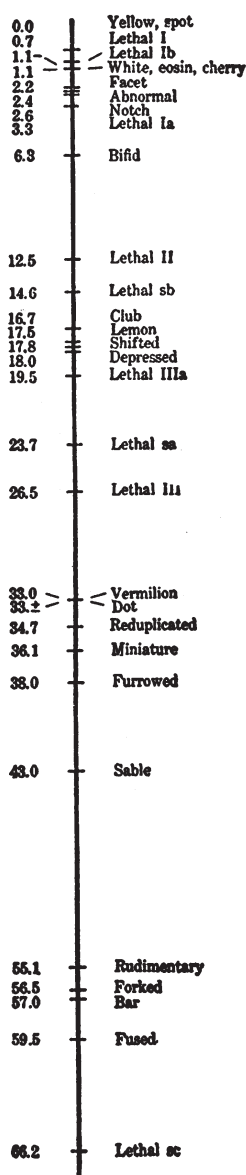


Рис. 1. Расположение генов, связанных с полом, у *Drosophila* (из статьи Morgan T.H. and Bridges C.B. Sex-linked inheritance in *Drosophila*. Carnegie Inst. Washington Publ. 1916. N 237)

не исключал, что имеется много данных, полученных при изучении созревания яиц или сперматозоидов, которые хорошо согласуются с теорией линейного расположения генов.

Линейное расположение генов он обычно демонстрировал на генетических картах хромосом (рис. 1).

Морган разработал количественные способы оценки линейности и приводит их в своих работах. В упомянутой книге 1924 года он, заключая главу IX о линейном расположении генов, говорит: «Что гены находятся в определенных участках хромосом и что в этом смысле между каждым из них имеются определенные расстояния, — эта идея ... представляется вполне правдоподобной» (стр. 116).

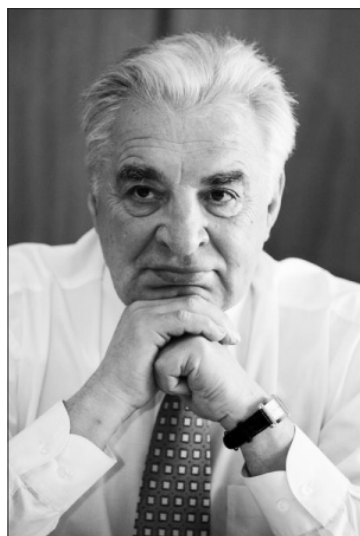
Из историко-научной литературы известно, что Николай Иванович Вавилов при посещении лаборатории Моргана в Колумбийском университете в 20-е годы XX века высказал мнение, что линейная теория гена слишком проста, чтобы быть истинной. Морган добродушно выслушал это возражение и ответил с улыбкой, что он готов отказаться от нее, но пока лучшего объяснения нет.

Прошедшие 100 лет со дня экстраординарного открытия Т.Х. Моргана подтвердили верность его точных наблюдений как относительно линейности расположения генов, так и основных положений хромосомной теории наследственности. Открытие цитоплазматической (не-хромосомной) наследственности не поколебало ее основ, равно как и определение генетических карт у других, кроме дрозофилы, животных, растений, микробов. Наличие кольцевой ДНК не противоречит общей доктрине линейности, поскольку и в ней общий линейный порядок генов выдерживается.

Безусловно, новые открытия молекулярной генетики уточнили теорию Моргана, привнесли в нее новый язык и более высокий уровень анализа. Однако многие ее концептуальные положения остались в силе.

ПЕРСОНАЛИИ

К 70-летию академика РАН А.И. Мирошникова



5 мая 2010 года исполнилось 70 лет одному из ведущих биохимиков и биотехнологов страны академику РАН Анатолию Ивановичу Мирошникову.

А.И. Мирошников является заместителем директора Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН), председателем президиума Пушкинского научного центра РАН, советником Президента РАН. С 1991 года по настоящее время заведует лабораторией биотехнологии ИБХ РАН.

Анатолий Иванович родился в 1940 году в селе Сагайдачное Белгородской области. По окончании в 1963 г. Московского института тонкой химической технологии работал стажером-исследователем в Новосибирском институте тонкой химической технологии СО АН СССР. С 1964 по 1983 гг. работал в Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина АН СССР. С 1983 по 1986 гг. состоял на должности заместителя начальника управления Министерства медицинской промышленности СССР, а с 1986 по 1987 гг. — помощника министра медицинской и микробиологической промышленности СССР. В 1987—1991 гг. занимал пост директора Всесоюзного института лекарственных растений ВАСХНИЛ (сейчас — РАСХН). В 1991 году он вернулся в ИБХ РАН, где трудится и поныне.

Научные интересы А.И. Мирошникова лежат в области структурно-функциональных исследований белков и пептидов: как в теоретическом аспекте, так и в плане практических разработок — создания генно-

инженерных технологий получения рекомбинантных препаратов главным образом медицинского назначения.

К числу наиболее известных работ А.И. Мирошникова относится получение первого отечественного генно-инженерного инсулина человека. Это исследование является примером реальной интеграции академической науки и производства, когда все — от идеи до серийного препарата — сосредоточено в одних руках. В результате опытное биотехнологическое производство ИБХ РАН наладило выпуск препаратов инсулина — «Инсуран Р» и «Инсуран НПХ», что имеет большое импортозамещающее значение в условиях абсолютной монополизации инсулинового производства иностранными компаниями. Президент России В.В. Путин в феврале 2004 г. посетил опытное производство ИБХ РАН, где выпускается инсулин, и высоко оценил его. Это достижение было упомянуто и в выступлении В.В. Путина как Председателя Правительства РФ 18 мая 2010 г. на Общем собрании РАН.

В коллективе, руководимом А.И. Мирошниковым, разработана технология получения отечественного генно-инженерного гормона роста (препарат «Растан»). Получены также штаммы-продуценты ряда важных лекарственных препаратов белково-пептидной природы. В его лаборатории ведутся поисковые исследования по разработке технологий получения актуальных противовирусных и противораковых препаратов на основе модифицированных нуклеотидов.

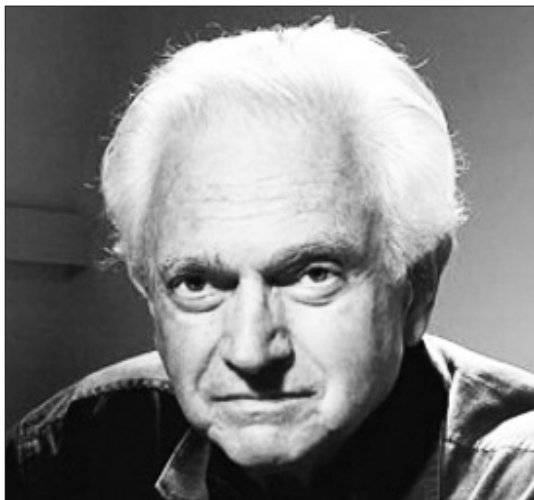
Он — автор более 300 научных работ. Им подготовлены 2 доктора и более 10 кандидатов наук. Избран членом-корреспондентом РАН в 1994 году, академиком — в 2005 году по Отделению биологических наук. Он ведет большую научно-организационную и общественную деятельность: заместитель председателя Научного совета РАН по научному приборостроению, член Координационного совета РАН по инновационной деятельности, вице-президент Российского общества биохимиков и молекулярных биологов.

А.И. Мирошников — дважды лауреат премии Правительства РФ в области науки и техники (1996 и 2005 гг.). Награжден медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени (1996 г.) и орденом Дружбы (2005 г.). Он является членом редколлегии журналов «Биотехнология», «Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии», «Acta naturae».

А.И. Мирошников являлся вице-президентом Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, входит в состав редсовета нашего журнала. Редколлегия сердечно поздравляет юбиляра и желает дальнейших творческих успехов.

СОБЫТИЯ ПЕРВОЙ ПОЛОВИНЫ 2010 ГОДА*

Некролог

Памяти Маршалла У. Ниренберга
(1927–2010)

15 января 2010 года в Нью-Йорке скончался от рака Маршалл Уоррен Ниренберг, один из выдающихся молекулярных биологов XX века. Он не дожил до 83-летия 3 месяца, продолжая заниматься научной работой. Болезнь была непродолжительной. Еще за два месяца до смерти Ниренберг принимал участие в симпозиуме, устроенном в его честь в Национальном институте здоровья (Бетесда).

К 80-летию ученого в нашем журнале была помещена статья (Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова, 2007. Т. 3, № 3, С. 62–67). Поэтому биографические сведения в некрологе можно опустить, следует лишь остановиться на отдельных аспектах.

Важным моментом являются российские корни Ниренберга. Его дед по отцовской линии (отец — Гарри Эдвард Ниренберг) был родом из Одессы и приехал в США 12-летним ребенком. Бабушка и дедушка по материнской линии (мать — Минерва Быковски) происходили из Польши, входившей в состав Российской империи.

В связи с этим кажется знаковым научный дебют Ниренберга на его исторической родине, в Москве, который состоялся в августе 1961 года на V Международном биохимическом конгрессе. 34-летний молодой ученый

приехал на конгресс, чтобы сообщить о своей совместной с Г.И. Маттеи работе о том, что синтетический полиурацил кодирует синтез полифенилаланина.

Доклад под неброским названием «Промежуточные процессы биосинтеза полифенилаланина, управляемые синтетической матрицей рибонуклеиновой кислоты (РНК)» на секции был выслушан небольшим числом участников и не вызвал реакции. Да и сам автор, скорее всего, еще не осознал истинное значение своего открытия. Однако среди присутствующих были лица, которые по достоинству оценили сделанное начинающим американским биохимиком и сказали об этом Ф. Крику. Тот своим авторитетом добился повторного заслушивания доклада Ниренберга на пленарном заседании для тысячной аудитории в огромном актовом зале МГУ, которая была наэлектризована осознанием значимости события — раскрытия генетического кода. Всем стало ясно, что человечество впервые открыло первую «букву» генетического шифра нуклеиновых кислот, предназначенного для одной кислоты (потом это любили сравнивать с Розеттским камнем).

Постепенно пришло полное понимание существа содеянного и к автору открытия, который стал делиться своими впечатлениями с коллегами и давать многочисленные интервью. О том времени он говорил: «Я буквально прыгал от радости. Как приятно и важно делать открытия!». Впоследствии он еще глубже прочувствовал, что его открытие имеет общебиологическое, универсальное значение, и нередко любил повторять: «Мы обнаружили, что все виды, все формы жизни на планете используют один и тот же язык — молекулярный язык. Мы сравнили код у бактерий с языком, используемым у амфибий, у млекопитающих, и нашли, что везде один и тот же язык ... Вы можете посмотреть деревья, цветы, белок, птиц и убедитесь, что все связано» (2005).

В некрологах памяти Ниренберга часто говорится о «гиганте» молекулярной биологии, «титане» и т.д. В этом есть известная доля вербального преувеличения, характерного для посмертных оценок, в которых горечь утраты как бы компенсируется возвышенными эпитетами. Но, оставив эмоции в стороне, нужно констатировать, что с уходом из жизни одного из создателей генетической доктрины, активного участника «молекулярно-биологической гонки» XX столетия закрывается целая эпоха в истории мировой науки. Остались лишь буквально единицы, 4–5 человек, которые были живыми

* Материал подготовлен В.С. Воробьевым

свидетелями этих великих событий (Сенгер Ф., Уотсон Дж., Корана Х., Балтимор Д., Берг П.).

Хочется еще раз упомянуть слова М. Ниренберга из его речи на приеме в честь Нобелевских лауреатов 1968 года: «Один индивидуум создает только заметку или то, что смешивается с результатами, полученными другими. Достижения, которые представлены здесь сегодня, обусловлены усилиями исследователей всего мира».

Второй Международный конгресс «ЕвразияБио-2010» (Москва, 12–15 апреля 2010 г.)

12–15 апреля 2010 г. в Москве (Центр международной торговли) состоялся II Международный Конгресс-выставка «ЕвразияБио-2010». Организатором выступило Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР) при поддержке Государственной Думы Федерального Собрания РФ, Федерального агентства РОССОТРУДНИЧЕСТВО, Российской академии наук, Торгово-промышленной палаты РФ, Союза предприятий биотехнологической отрасли. В мероприятии приняли участие ведущие специалисты по биотехнологии, представители науки, бизнеса, государственных ведомств со всей России и из 40 стран мира. В адрес Конгресса поступили приветствия от Министра образования и науки РФ А.А. Фурсенко, президента Торгово-промышленной палаты РФ Е.М. Примакова.

Конгресс открыл почетный председатель Оргкомитета, первый заместитель Председателя Государственной Думы РФ О.В. Морозов. В своем выступлении он подчеркнул высокую научную, производственную и социальную значимость биотехнологии как приоритета XXI века и отметил роль Международного конгресса «ЕвразияБио» в качестве эффективного инструмента сотрудничества ученых и практиков на евразийском пространстве.

Конгресс отличался высоким уровнем представительства зарубежных специалистов, среди них: Стивен Беррилл — ведущий мировой инвестор в области биоиндустрии (США), Лерой Худ — один из пионеров биотехнологии, профессор (США), Баласубраман Натеш — советник по биотехнологии Правительства Индии и др. Кроме того, в Конгрессе участвовали видные государственные деятели: Майве Рут — директор отдела биотехнологии Евросоюза, Нияма Энхболд — вице-спикер Парламента Монголии, Таир Мансуров — Генеральный секретарь ЕврАзЭС и др.

Деловой тон Конгрессу задавало первое пленарное заседание, на котором с программными докладами выступили представитель Правительства РФ и иностранные гости. В своем докладе А.В. Хлунов, директор Департамента науки, высоких технологий и образования Правительства РФ, изложил государственную позицию в сфере биотехнологии. Он указал на то, что Правительство РФ и профильные министерства в последние годы уделили большое внимание развитию современной фармацевтики, сформировав целевую стратегию «Фарма-2020». Докладчик подчеркнул также, что существует абсолютная необходимость разработки отдельной программы по биоэкономике для России и все усилия по созданию данной программы будут поддержаны Правительством РФ.

В пленарных выступлениях выдающихся зарубежных представителей науки и бизнеса — Лероя Худа и Стивена Беррилла — было сообщено о последних достижениях и перспективах развития биотехнологии, особенно в медицинском плане. Речь идет о создании медицины будущего, так называемой персонализированной медицины, которая будет использовать постгеномные технологии и новейшие биоматериалы для диагностики, профилактики и лечения каждого индивида.

Состоялась пленарная дискуссия о национальных стратегиях развития биоэкономике с участием представителей России, Евросоюза, Китая, Индии, Монголии, в которой было констатировано значение интеграции идей и практических решений для прогресса биотехнологии в Евразии.

Главными направлениями «ЕвразияБио-2010» были выбраны: «Медицина и здоровье», «Топливо и энергия», «Промышленность», «Продовольствие и сельское хозяйство», «Системная биология и биотехнология», «Организационно-экономические основы биотехнологии», «Биотехнология в мире». В рамках этих направлений в период работы Конгресса состоялось более 50 заседаний, круглых столов, рабочих совещаний. Было заслушано свыше 200 докладов ведущих отечественных и зарубежных биотехнологов. Мероприятие позволило оценить состояние биоиндустрии в целом в мире и в отдельных регионах, с акцентом на Евразию.

На этом авторитетном форуме были задействованы наиболее современные формы научного общения и бизнес-коммуникаций: партнеринг, бизнес-школа по биоэкономике, многопрофильная выставка, презентации компаний, биорегионов, программ и проектов.

Содержательная программа Конгресса характеризовалась широкой географией российских регионов,

сделавших ставку на приоритетную поддержку биотехнологии. Так, например, Республика Татарстан и Чувашская Республика выставили свои долгосрочные программы развития биотехнологии и поделились опытом с другими субъектами РФ. Следует отметить, что в Конгрессе принимали участие другие регионы, представившие свои экспозиции и перспективные планы создания собственных биотехнологических программ — Пензенская и Кировская области.

Одной из центральных тем Конгресса стало обсуждение долгосрочной Стратегии развития биотехнологии в Российской Федерации до 2020 года, инициаторами создания которой выступили ОБР и Союз предприятий биотехнологической отрасли. Этот документ прошел стадию предварительной экспертизы и общественного обсуждения в более 50 регионах РФ. На Конгрессе данная Стратегия получила поддержку и на международном уровне. Теперь предстоит окончательная доработка документа и представление его в органы государственной власти.

В ходе партнеринга был заключен ряд соглашений о реализации совместных проектов: по глубокой переработке зерна (Чувашская Республика, Пензенская область), по лесной биотехнологии (Пензенская область) и др. Было подписано соглашение между ОБР и ФАВА о создании российско-индийского биотехнологического портала. Заключены договора о сотрудничестве между Японской биопромышленной ассоциацией и Союзом предприятий биотехнологической отрасли, Японской биовенчурной ассоциацией и ОБР и др.

Успеху Конгресса во многом способствовала широкомасштабная программа сателлитных мероприятий. Под его эгидой состоялись: конференция «Медбиотек» (организаторы — Российская академия наук, ОБР), форум «Биотехнология и общество» (организаторы — ОБР, Институт философии РАН), конференция «Биоэтанол-2010» (организаторы — Национальная биотопливная ассоциация, ОБР), VI Международный симпозиум «ЕС-Россия: сотрудничество в области биотехнологии, сельского, лесного, рыбного хозяйства и пищи в 7 рамочной программе ЕС» (организатор — Национальная контактная точка по FP7, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН).

Уникальным событием Конгресса стало подведение итогов всероссийского конкурса журналистов по теме «Биотехнология в России — наука, экономика, общество», к которому допускались журналистские работы за 2009 год (организаторы — ОБР, Союз журналистов России). Поступило около 90 заявок из 15 регионов

страны. Премиями в разных номинациях были отмечены 17 публикаций и видеосюжетов на актуальные биотехнологические темы.

Конгресс вызвал большой общественный резонанс благодаря активному взаимодействию со СМИ и информационной спонсорской поддержке ведущих отечественных медиа-структур («Российская газета», журнал «Эксперт», радио «Business FM», интернет-портал Infox.ru и др.).

Знаменательным итоговым мероприятием стало учреждение в рамках Конгресса Евразийской федерации биотехнологии — ЕАВФ. Учредителями ЕАВФ выступили Россия, Украина, Казахстан, Индия, Монголия, Австрия, которые подписали соответствующий документ. Намерения присоединиться к Федерации высказали Китай, Словения, Финляндия. В дальнейшем указанный союз будет расширяться через вступление в него других стран евразийского региона, включая постсоветское пространство. Такая Федерация необходима для содействия устойчивому развитию биоэкономики и сотрудничества по биотехнологии в Евразии и за ее пределами. ЕАВФ значительно облегчит диалог между учеными, промышленностью, регулятивными и государственными органами, представителями бизнеса, занятыми в сфере биоиндустрии.

На заключительном заседании Конгресса участники высказали единодушное мнение о важности и востребованности конгресса «ЕвразияБио» как объединяющей инициативы общественных организаций и бизнес-сообщества, направленной на ускоренное развитие биотехнологии, являющейся основой современной экономики в большинстве стран мира. Принято решение о регулярном ежегодном проведении данного мероприятия в ключевых городах Евразийского пространства (Москва, Санкт-Петербург, Казань, Киев, Вена, Астана, Улан-Батор и др.).

18 мая 2010 года в Москве на Общем собрании РАН состоялось вручение Большой золотой медали имени М.В. Ломоносова РАН Вадиму Тихоновичу Иванову, академику РАН, директору Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН — за выдающийся вклад в развитие биоорганической химии и японскому химику Нойори Риоджи — за выдающийся вклад в развитие органической химии и каталитического асимметричного синтеза.

17 июня 2010 года в Москве на торжественном заседании, посвященном Дню медицинского работника,

состоялось вручение премии «Призвание» Джеймсу Уотсону, лауреату Нобелевской премии по физиологии и медицине 1962 г. (Национальная медицинская премия «Призвание» учреждена Первым каналом телевидения при поддержке Минздравсоцразвития России). В ответном слове американский ученый кратко рассказал о перспективах сотрудничества с российскими исследователями по проблеме генетических основ онкогенеза (накануне 15 июня он выступил с лекцией на биофаке МГУ, 16 июня он посетил Российский онкологический научный центр имени академика Н.Н. Блохина РАМН). В церемонии награждения лауреатов премии «Призвание» принимали также два других Нобелевских лауреата — Кэрол Грейдер (открывшая теломеразу, Нобелевская премия по физиологии и медицине 2009 года) и Ферид Мурад (фармаколог, исследовавший роль NO в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, Нобелевская премия по физиологии и медицине 1998 года). Телеверсия указанного мероприятия вышла в эфир 20 июня с.г.

ПУБЛИКАЦИИ

Glick B.R., Pasternak J.J., Patten Ch.L. *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*. 4th ed. — ASM Press, 2009. — 1000 p.

Резюме. Книга представляет собой четвертое издание известного руководства по биотехнологии. Она освещает последние достижения в области промышленной, сельскохозяйственной, фармацевтической и биомедицинской биотехнологии. В особенности это касается использования методов секвенирования ДНК, создания лекарственных средств, вакцин, трансгенных растений и животных. В настоящем издании содержится 645 рисунков (из них — 240 новых) и 113 таблиц. Имеются резюме по главам. Кроме того, каждая глава снабжена списком литературы, а также вопросами для самоконтроля.

The handbook of genetics and society: mapping the new genomic era (genetics and society) / Ed. by Atkinson P., Glasner P., Lock M. — Routledge, 2009. — 500 p.

Резюме. В руководстве обсуждаются социальные, политические, этические и экономические последствия использования новых открытий в области наук о жизни. В нем применяется междисциплинарный подход при анализе исследований по проблемам генетики, геномики

и других направлений. Материал сгруппирован по семи главным темам.

Plunkett's Biotech & Genetics Industry Almanac 2010. — Plunkett's Research, Ltd., 2009. — 569 p.

Резюме. Альманах является справочным пособием по вопросам бизнеса в сфере биотехнологии, генетики, протеомики и связанных с ними направлений. Приведен перечень ведущих биотехнологических компаний, освещены современные тенденции в области генетики, технологий, статистики и финансов, дан глоссарий. Книга снабжена многочисленными справочными материалами и указателями.

Чиркин А.А., Данченко Е.О. *Биохимия.* — Медицинская Литература, 2010. — 624 с.

Аннотация. Учебное руководство составлено с учетом новейших достижений в биохимии белков, углеводов, липидов, нуклеиновых кислот, витаминов, гормонов, минеральных веществ. Особое внимание уделено знакомству с современными методами биохимических исследований, а также вопросам динамической биохимии. Отличительной особенностью книги является функциональный принцип изложения биохимического материала, необходимого для практического решения фундаментальных и прикладных проблем биологии и медицины. В предлагаемом учебном руководстве представлен богатый набор справочных материалов и клинико-биохимических примеров. Весь материал представлен в виде примерно равных по объему 36 глав, 33 из которых являются общими для всех обучаемых. Глава 34 имеет преимущественное отношение к студентам-медикам, глава 35 — к студентам-фармацевтам и глава 36 — к студентам-стоматологам. В курсе предусмотрено количество глав на 2 семестра обучения (одна глава + 1 лабораторное занятие в неделю). В главе 1 представлены достижения ученых, удостоенных Нобелевских премий, имеющих отношение к биохимии, за последние 50 лет. На основе этих работ строится курс современной биохимии. В главе 2 приведены суммированные характеристики белков и аминокислот параллельно с описанием современных методов исследования белков. В главе 3 представлены методы изучения первичной структуры белков. В главе 4 описаны современные методы выделения и количественного определения белков. В главе 6 для иллюстрации положения об активации проферментов представлена современная схема свертывания крови. В главе 10 изложены современные представления об

активных формах кислорода, антиоксидантной системе и явлениях окислительного и восстановительного стресса. В главе 11 даны современные представления о сущности и количественной оценке биоэнергетических внутриклеточных процессов. В главе 17 изложены представления о первичных, вторичных и третичной желчных кислотах. В главе 24 приведены современные методы исследования нуклеиновых кислот и описана полимеразная цепная реакция. В главе 25 описана обратная транскрипция и технология рекомбинантных ДНК. В главе 27 представлены критерии нормальной обеспеченности организма витаминами. В главе 31 даны сводные данные о гормонах. В главе 32 описаны рекомендуемые витаминно-минеральные комплексы для коррекции метаболизма, представлены суммированные данные о сигнальных молекулах, белках для их транспорта, белках — участниках различных биологических контактов. Здесь же приведены референтные нормы для основных гормонов. В главе 33 представлены наиболее важные для лабораторной диагностики скрининговые биохимические тесты. В главе 34 даны биохимические особенности различных тканей и описаны механизмы апоптоза и опухолевой трансформации клеток. Глава 35 посвящена фармакодинамике и фармакокинетике лекарств и глава 36 включает материалы по стоматологической биохимии. В учебном руководстве применены специальные приемы для идентификации излагаемого материала. Представлены примеры современного описания химизма изучаемых процессов. Авторы придерживаются правила сокращенного обозначения нуклеотидов и других биологически важных молекул в русской транскрипции (НАД, ФАД, АТФ, КоА). В учебном руководстве по биохимии введены такие понятия как: «сигнальные молекулы», «оксидативный стресс», «опухолевая трансформация клеток» и др. Учебное руководство предназначено для студентов, магистрантов и аспирантов биологических и медицинских вузов и может использоваться также в практической деятельности врачами, биологами, биоэкологами и валеологами.

Загоскина Н.В., Назаренко Л.В. Биотехнология: теория и практика: учебное пособие для вузов. — Оникс, 2010. — 496 с.

Аннотация. Учебное пособие соответствует требованиям Государственного образовательного стандарта по специальности «Биология». В свете современных представлений о биотехнологии как важнейшем научном направлении и отрасли промышленности изложены основы клеточной, тканевой, генетической и энзиматической инженерии, промышленной биотехнологии, в том числе получения первичных и вторичных метаболитов. Особое внимание уделено нанобиотехнологии, экологической биотехнологии, криосохранению, а также вопросам биобезопасности и государственного регулирования генно-инженерной деятельности. В специальном разделе прослежены исторические вехи развития биотехнологии, приведен словарь терминов. Выгодно отличает данную книгу наличие в ней лабораторного практикума по биотехнологии. Предназначен для студентов высших учебных заведений, а также для аспирантов, научных сотрудников и слушателей факультетов повышения квалификации. Допущено Учебно-методическим объединением вузов.

Медицинская генетика / Под ред. Бочкова Н.П. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 624 с.

Аннотация. Данная книга представляет собой перевод последнего издания всемирно известного руководства по медицинской генетике. Каждое из шести изданий этой книги становилось значимым событием в этой захватывающей и быстро развивающейся науке, в которую всё больше и больше внедряются современные достижения молекулярной генетики. Настоящее издание содержит новейшую информацию о молекулярной диагностике, проекте «Геном человека», фармакогенетике, генетике развития и генетике рака; для лучшего представления о том, как применять знания по генетике в повседневной практике, включено множество клинических примеров. В книге содержатся более 240 высококачественных фотографий различных генетических заболеваний человека. Следует отметить практическую ориентацию издания, в связи с чем оно, несомненно, будет полезно не только студентам медицинских вузов, специалистам-генетикам, но и всем практикующим врачам.

ПРЕДСТОЯЩИЕ МЕРОПРИЯТИЯ 2010 ГОДА

КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ

28–29 октября 2010 года в Санкт-Петербурге состоится Международный саммит по трансферу технологий (Tech Transfer Summit). Организаторы: TTS, Ltd (США), Союз предприятий биотехнологической отрасли России.

Основные направления саммита:

- глобальная биоэкономика,

- биокластеры и биорегионы,
- трансфер технологий,
- интеллектуальная собственность,
- лицензирование,
- стратегические инвестиции в биотехнологию.

Ожидается участие и выступления известных специалистов: G. Steven Burrill (США), Iain Gillespie (ОЭСР), Gerold Breit (Канада), Mark Rohrbaugh (США), Peter Ruile (Германия), Cecile Tharaud (Франция), Sampo Makinen (Финляндия) и др. Российские участники планируют поставить на обсуждение проблему биорегионов и сотрудничества в рамках конгресса «ЕвразияБио» и международных ассоциаций профильных специалистов. Справки: www.biorosinfo.ru.

1. Рукописи статей и других материалов представляются в редакцию на бумажном носителе (формат А4) или в электронном виде (на дискете или по электронной почте с обязательным уведомлением).
2. Текст набирается в Microsoft Word, шрифт – Times New Roman, размер шрифта – 12, межстрочный интервал – полуторный. Размещение на листе формата А4 со стандартными полями. Кроме текста статьи, добавляются 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, но без резюме; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде в формате TIF или JPEG. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале – литература на русском языке, затем – на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные установки (Index Medicus и др.).
6. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.

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



Подписано к печати 21.06.10
Формат 60/90¹/₈. 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. Ежегодно проводится Съезд Общества биотехнологов России.

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

ОБР имеет отделения в 55 регионах России и объединяет свыше 2000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

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

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