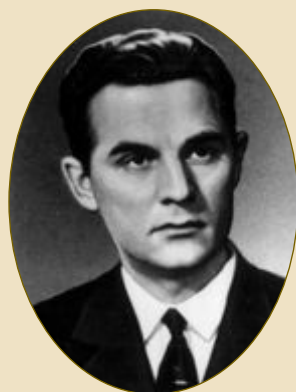


· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

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

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

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



**Т. 8, № 1**  
**2012**

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРТ ·

2012, Т. 8, № 1

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

**Научно-практический журнал**

**Основан в 2005 году**

**Главный редактор**

Р.Г. Василев

**Редакционная коллегия**

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

**Редакционный совет**

В.А. Быков (Москва), В.Г. Дебабов (Москва), С.Х. Дегтярев (Новосибирск),  
В.В. Зверев (Москва), В.Т. Иванов (Москва), Л.В. Калакуцкий (Пушино),  
М.П. Кирпичников (Москва), О.И. Киселев (Санкт-Петербург), А.И. Мирошников (Москва),  
Т.В. Овчинникова (Москва), О.Н. Озолинь (Пушино), А.Н. Панин (Москва),  
В.О. Попов (Москва), К.Г. Скрябин (Москва), Р.М. Хаитов (Москва),  
В.И. Швець (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@mail.ru

*Издается при поддержке*

*Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова*

ISSN 1996-4741

© Информационно-аналитический центр  
медико-социальных проблем, 2012.

**СОДЕРЖАНИЕ**

**Колонка главного редактора**

К читателям. *Р.Г. Василев* ..... 4

**Оригинальные статьи**

Получение рекомбинантного белка L наружной мембраны *Pseudomonas aeruginosa* и исследование его иммуногенных и защитных свойств.

*Н.А. Михайлова, А.А. Калошин* ..... 5

Определение этилового спирта биосенсором на основе иммобилизованных микробных клеток *Glucanobacter* в образцах, содержащих уксусную кислоту.

*А.Н. Решетилев, А.Е. Китова* ..... 11

Новая метилзависимая сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза *MteI* расщепляет девятинуклеотидную последовательность 5'-G(5mC)G(5mC)NG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GN(5mC)G(5mC)G-5'.

*В.А. Чернухин, Д.А. Гончар, Е.В. Килева, В.А. Соколова, Л.Н. Голикова, В.С. Дедков, Н.А. Михненко, С.Х. Дегтярев* ..... 16

Технология получения препарата «Стафилолейкин» из осадка «Б» — отхода производства антистафилококкового донорского иммуноглобулина.

*Т.М. Афанасьева, В.П. Петровских, А.М. Николаева, А.В. Казьянин, А.Н. Мац* ..... 27

Кулинарные фаршевые рыбные изделия с использованием пробиотической композиции.

*Н.Л. Корниенко, О.В. Бредихина* ..... 32

**Обзоры**

Обоснование критериев идентификации происхождения морских млекопитающих (районов промысла) по показателям безопасности.

*Е.В. Сергиенко, А.И. Бочкарев, А.Г. Мосейчук* ..... 36

Морские биотехнопарки — стратегическая линия развития прибрежных территорий Дальнего Востока.

*С.И. Масленников* ..... 42

Перспективы совершенствования правового регулирования в области биотехнологии в Российской Федерации.

*Ю.А. Петушкова* ..... 46

Медико-биологические, правовые и этические проблемы трансплантации кроветворных стволовых клеток в России.

*Р.М. Хаитов, Н.Ю. Хаманева, Л.П. Алексеев, А.А. Рагимов, К.В. Уткин, М.Н. Болдырева, П.Л. Алексеева* ..... 55

Биотехнология как основа инновационной экономики.

*Р.Г. Василев* ..... 63

**Страницы истории**

Юбилейные и знаменательные даты 2012 года ..... 68

**Информация**

Предстоящие мероприятия 2012 года ..... 73

**Правила для авторов** ..... 78

**CONTENTS**

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

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

**Original articles**

Preparation of recombinant outer membrane protein L of *Pseudomonas aeruginosa* and study of its immunogenic and protective properties.

*N.A. Mikhailova, A.A. Kaloshin* ..... 5

Detection of ethanol by biosensor based on immobilized microbial cells *Gluconobacter* in samples containing acetic acid.

*A.N. Reshetilov, A.E. Kitova* ..... 11

A new methyl-directed site-specific DNA endonuclease *MteI* cleaves nine nucleotides sequence 5'-G(5mC)G(5mC)<sup>^</sup>NG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GN<sup>^</sup>(5mC)G(5mC)G-5'.

*V.A. Chernukhin, E.V. Kileva, V.A. Sokolova, D.A. Gonchar, L.N. Golikova, V.S. Dedkov, N.A. Mikhnenkova, S.Kh. Degtyarev* ..... 16

Production technology of preparation «*Staphyloleikin*» from sediment B – waste production of donor's antistaphylococcal immunoglobulin.

*T.M. Afanasieva, V.P. Petrovskiyh, A.M. Nikolaeva, A.V. Kazyanin, A.N. Matz* ..... 27

Culinary stuffing fish products using probiotic composition.

*N.L. Kornienko, O.V. Bredihina* ..... 32

**Reviews**

Justification of the criteria for determining the origin of marine mammals (the area of hunting) on the safety parameters.

*E.V. Sergienko, A.I. Bochkarev, A.G. Moseichuk* ..... 36

Marine biotechnology parks – a strategic line of development of coastal areas of the Far East.

*S.I. Maslennikov* ..... 42

Prospects for improving the legal regulation of biotechnology in the Russian Federation.

*Ju.A. Petushkova* ..... 46

Medical and biological, legal and ethical issues haematopoietic stem cell transplantation in Russia.

*R.M. Khaitov, N.Yu. Khamaneva, L.P. Alexeev, A.A. Ragimov, K.V. Utkin, M.N. Boldyreva, P.L. Alexeeva* ..... 55

Biotechnology as a basis for an innovative economy.

*R.G. Vasilov* ..... 63

**Pages of history**

Anniversary and significant dates 2012 ..... 68

**The information**

Forthcoming actions 2012 ..... 73

**Rules for authors** ..... 78

## К читателям

Первый номер 2012 года содержит ценную информацию по разным проблемам современной биотехнологии и молекулярной биологии. В первую очередь, это относится к фундаментальным разработкам. Так, профессор А.Н. Решетиллов (Пушино), продолжая свою традиционную тему биосенсоров, сообщает о возможностях ферментного биосенсора, обладающего более высокой селективностью по сравнению с микробным. Коллектив сотрудников НПО «СибЭнзим» (Новосибирск) представил материалы о своих последних находках в изучении сайт-специфических ДНК-эндонуклеаз, что открывает перспективы нового направления исследований.

Хорошие работы получены от микробиологов. Специалисты из НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН (Михайлова Н.А., Калошин А.А.) выделили и исследовали рекомбинантный белок L наружной мембраны синегнойной палочки, а А.М. Николаева с коллегами из Перми разработали технологию получения препарата «Стафилолейкин».

В номере помещена подборка статей о морской биотехнологии: С.И. Масленников (Институт биологии моря ДВО РАН, Владивосток) рассказал о перспективах создания кластера морских биотехнопарков в прибрежных территориях Дальнего Востока; сотрудники ВНИРО (Москва) представили две работы — по обоснованию промысла морских млекопитающих для пищевой биотехнологии и по использованию пробиотиков на основе морских бурых водорослей в изготовлении рыбных пищевых продуктов.

Печатаются обзорные исследования правового регулирования в области биотехнологии (Петушкова Ю.А.) и трансплантации кроветворных стволовых клеток (Хаитов Р.М., Алексеев Л.П. и др.), а также анализ тенденций развития инновационной биоэкономики в России (Василов Р.Г.).

По традиции в рубрике «Знаменательные и юбилейные даты» приводится соответствующая информация на 2012 год, включая научные события и круглые даты персоналий по профилю журнала.

В информационном разделе дается объявление о предстоящей Международной молодежной конференции «Биология — наука XXI века», которая состоится в Москве 24 мая 2012 года на базе РЭУ им. Г.В. Плеханова и часть материалов которой публикуется в настоящем номере.

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

# ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА L НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ PSEUDOMONAS AERUGINOSA И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО ИММУНОГЕННЫХ И ЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ

Н.А. МИХАЙЛОВА\*, А.А. КАЛОШИН

ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, Москва

С целью разработки кандидатного вакцинного препарата нами использован ген, кодирующий белок L наружной мембраны *Pseudomonas aeruginosa*. Последовательность, кодирующая белок OprL, клонирована в плазмиде рQE-30 и экспрессирована в *Escherichia coli* M15. Рекombинантный белок для экспериментов на животных очищен аффинной хроматографией в колонках с Ni-NTA агарозой. Рекombинантным белком иммунизировали кроликов и мышей. Выявлено значительное увеличение титров специфических IgG антител у иммунизированных животных. Сыворотки крови иммунизированных животных обладали специфическими антибактериальными свойствами *in vitro*. При оценке превентивной активности кроличьих сывороток к белку OprL показан защитный эффект в сравнении с сыворотками крови от интактных животных. Индекс эффективности иммунных сывороток оказался примерно в два раза выше, чем у сывороток от интактных кроликов. Протективные свойства рекombинантного белка оценили после двукратной иммунизации мышей. При использовании иммунизационной дозы 25 мкг установлен самый высокий индекс эффективности (3,0).

**Ключевые слова:** *Pseudomonas aeruginosa*, белок L наружной мембраны (OprL).

## Введение

Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) является одним из основных возбудителей нозокомиальных инфекций человека. Большинство штаммов этого патогена высоко резистентно к применяемым в клинике антибиотикам и химиотерапевтическим средствам, что обуславливает актуальность исследований по разработке иммунопрепаратов для профилактики и терапии заболеваний, вызываемых синегнойной палочкой [1, 5, 6].

Одним из наиболее иммуногенных компонентов бактериальной клетки *P. aeruginosa* являются так называемые белки наружной мембраны (outer proteins — Opr) [4, 7]. Показано, что эти белки, выделенные из бактерии, способны при иммунизации успешно защищать от поражения синегнойной инфекцией ожоговых больных [8]. Среди белков наружной мембраны наиболее исследованы пориновый белок F (OprF) и структурный липопротеин I

(OprI). Нами ранее получены и исследованы рекombинантные белки OprF [3] и OprI [2]. К настоящему моменту имеются данные об успешном использовании на добровольцах препаратов, созданных на основе рекombинантных белков, включающих в себя аминокислотные последовательности белков OprF и OprI *P. aeruginosa* [9].

Для характеристики более полного спектра протективных антигенов *P. aeruginosa* представляет интерес получить и исследовать белок наружной мембраны L (OprL) с молекулярной массой 17,9 кДа, который относится к классу липопротеинов и представляет важную составную часть наружной мембраны бактерии.

## Материалы и методы

Последовательность, содержащая ген *oprL*, получена с помощью ПЦР на основе геномной ДНК *P. aeruginosa*, которую выделили из бактериальных клеток штамма PA103 с использованием протеиназы K [10]. Праймеры для ПЦР подобраны на основании данных базы GenBank и содержали на 5'-концах сайты рестрикции BamH I и Hind III, по которым амплификат был встроен в полилинкер плазмиды рQE-30 (QIAGEN). При трансформации использовался штамм *E. coli* M15 (QIAGEN).

Для экспрессии рекombинантного гена применяли изопропил- $\beta$ -d-тиогалактопиранозид (ИПТГ). Электро-

© 2012 г. Михайлова Н.А., Калошин А.А.

\* **Автор для переписки:**

Михайлова Наталья Александровна  
д.м.н., профессор, заведующий лабораторией протективных антигенов, заместитель директора по научной работе НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН  
Тел./факс: +7 (495) 917-56-30  
E-mail: n\_michailova@inbox.ru

форез белковых продуктов проводили в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лэммли [10]. Очистку рекомбинантного белка осуществляли методом аффинной хроматографии в колонке с Ni-NTA агарозой (QIAGEN) в денатурирующих условиях (фосфатный буфер, содержащий 8 М мочевины). Очищенный рекомбинантный белок растворяли в 50 мМ Tris-HCl (рН 9,0) с помощью ступенчатого диализа. Вначале проводили диализ против растворов, содержащих 6, 4, 2 и 1 М мочевины, а затем трижды против чистого буферного раствора, объем которого превышал в 50 раз объем препарата в диализном мешке. Для иммунизации животных (мышей и кроликов) рекомбинантный белок разводили в фосфатно-солевом буфере и сорбировали на геле гидроокиси алюминия.

Препараты белков и сывороток вводили мышам массой 16–18 г внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл. Для получения гипериммунной сыворотки использовали кроликов породы «шиншилла» массой 2–2,5 кг, которых иммунизировали по схеме, включающей в себя пять подкожных инъекций, производимых с двухнедельным интервалом. Все работы с животными проводили в соответствии с положениями «Правил проведения работ и использованием экспериментальных животных».

Иммуноблоттинг и ИФА проводили по общепринятой методике, используя для анализа специфичности сыворотку крови кролика, иммунизированного цельноклеточной инактивированной культурой *P. aeruginosa* (штамм PA170015). Данный штамм в 1976 году был получен из коллекции бактериальных культур Венгерского национального института гигиены от доктора Б. Лани (B. Lanyi). Антибактериальная активность сывороток оценивалась *in vitro* на модели торможения роста культуры *P. aeruginosa*

(штамм PA170015) с использованием микробиологического анализатора. При анализе защитных свойств препаратов интактных и иммунизированных мышей заражали внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл различными дозами живой вирулентной культуры *P. aeruginosa* (штамм PA170015). Учет погибших животных проводили в течение пяти дней.

Статистические расчеты осуществляли с помощью программы «Statistica 6,0». Достоверность результатов определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Суждение о наличии существенных различий принимали при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Синтезированная в результате ПЦР нуклеотидная последовательность размером 0,5 kb после встраивания в плазмиду pQE-30 оказалась под контролем модифицированного прокариотического промотора фага T5. Данные секвенирования показали, что клонированный ген совпадал с таковым из базы данных GenBank. При анализе биомассы, полученной после экспрессии рекомбинантного гена, выявлено наличие специфического продукта с размером около 20 кДа (расчетная масса составляла 19,2 кДа), который отсутствовал в клетках продуцента, выращенных без ИПТГ (рис. 1А).

В плазмиде pQE-30 между инициаторным кодоном и полилинкером содержалась нуклеотидная последовательность, кодирующая следующие аминокислоты: Arg-Gly-Ser-His-His-His-His-His-Gly-Ser. Эта дополнительная шестигистидиновая последовательность, содержащаяся на N-конце рекомбинантного белка, позволила провести его хроматографическую очистку в колонке с Ni-сефарозой (рис. 1А).

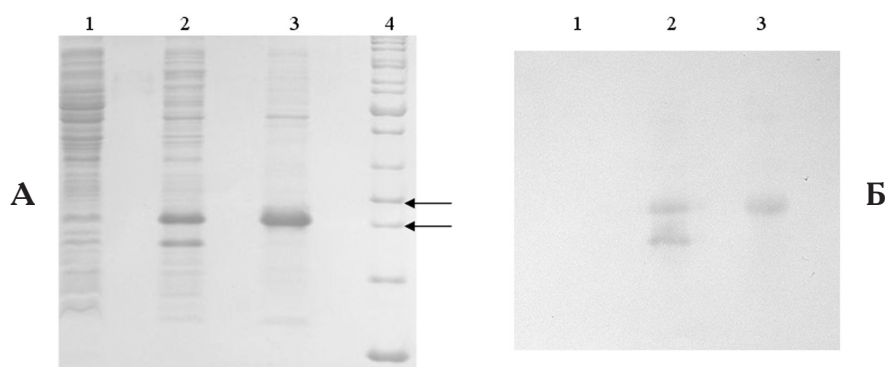


Рис. 1. Анализ белковых продуктов, полученных в результате экспрессии гена *oprL*, встроенного в плазмиду pQE-30, и хроматографической очистки рекомбинантного белка. А — ПААГ, окрашенный Кумасси R-250. Б — нитроцеллюлозная мембрана после иммуноблоттинга. Треки: А1 — белки продуцента *OprL*, полученные при выращивании биомассы без индукции экспрессии; Б1 — биомасса исходных нетрансформированных клеток штамма M15 (*E. coli*); А2 и Б2 — продукты индуцированного продуцента *OprL*; А3 и Б3 — очищенный рекомбинантный белок *OprL*; А4 — весовой белковый маркер (стрелками отмечены молекулы маркера с размерами 25 и 20 кДа)

Рекомбинантный белок проявил высокую специфичность при взаимодействии с поликлональной кроличьей сывороткой к *P. aeruginosa*, а белки исходных не-трансформированных клеток штамма M15 не реагировали с ней (рис. 1Б).

Для анализа антигенности рекомбинантный белок вводили трехкратно с интервалом в две недели пяти группам мышей по 100, 50, 25, 12,5 и 6,25 мкг на одну дозу инъекции. Через две недели после каждого введения по пять мышей из групп использовали для получения сыворотки крови. Контролем служили сыворотки, полученные от чистых животных той же партии. При анализе групповых пулов полученных сывороток в ИФА (рис. 2) установлено, что рекомбинантный белок стимулировал синтез специфических антител, при этом наблюдалась зависимость их накопления от доз и кратности иммунизаций. Максимальные титры антител наблюдались в сыворотках мышей после второй иммунизации в дозе 50 мкг и после третьей в дозе 25 мкг.

разведение сывороток

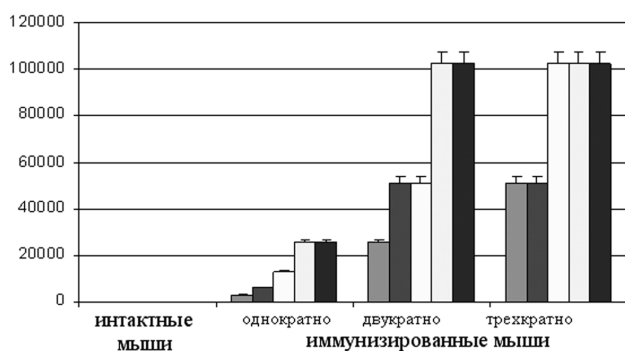


Рис. 2. Анализ накопления специфических антител в организме мышей, иммунизированных рекомбинантным белком OpgL.

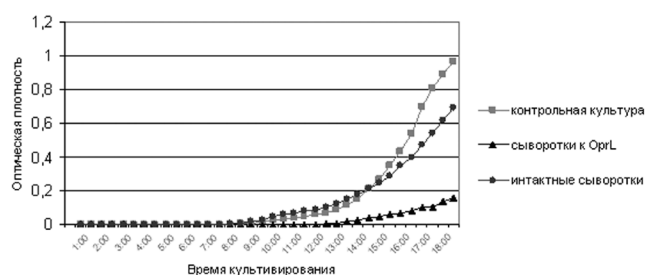
Столбики гистограмм данных по анализу пулов сывороток крови мышей, получавших следующие дозы рекомбинантного белка (мкг): 6,25; 12,5; 25; 50 и 100

С целью исследования протективной активности провели двукратную иммунизацию мышей рекомбинантным белком OpgL в дозах: 50, 25, 12,5 и 6,25 мкг. Через две недели после последней инъекции животным были введены различные дозы живой вирулентной культуры *P. aeruginosa*. При этом использовали штамм PA170015, отличительной особенностью которого являлось отсутствие токсигенности, связанной с секрецией экзотоксинов. Контрольной группе (интактные мыши той же партии) вводили от 25 до 400 млн., а опытным

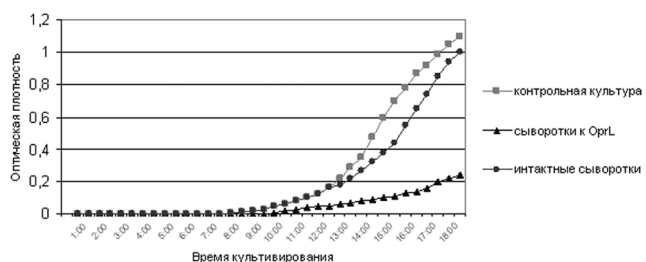
мышам — от 50 до 800 млн. микробных клеток.  $LD_{50}$  в группе интактных мышей составила 73 млн., а для иммунизированных групп животных — от 148 до 222 млн.

Оптимальная иммунизирующая доза соответствовала 25 мкг белка. Индекс эффективности (ИЭ) защитных свойств в группе мышей, получавших эту дозу (отношение  $LD_{50}$  для иммунизированных мышей к  $LD_{50}$  в контрольной группе), равнялся трем (табл. 1).

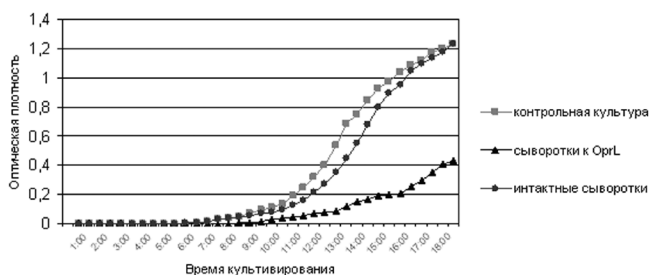
Десять животных из группы, иммунизированных дозой 50 мкг, использованы для получения пула сывороток крови для анализа антибактериальных свойств. Они протестированы in vitro на модели торможения роста культуры *P. aeruginosa* (рис. 3).



А



Б



В

Рис. 3. Динамика роста культуры *P. aeruginosa* при исследовании антибактериальных свойств мышинных сывороток к рекомбинантному белку OpgL.

А. При посевной дозе  $10^3$  КОЕ.

Б. При посевной дозе  $10^4$  КОЕ.

В. При посевной дозе  $10^5$  КОЕ



Таблица 1

## Анализ защитных свойств рекомбинантного белка OrgL

Группа мышей	Доза заражения, млн. микробных клеток					LD <sub>50</sub> , млн. м. к.*	ИЭ
	Количество мышей павших/выживших						
Иммунизированные дозой 50 мкг белка	800	400	200	100	50	206±29 (ρ<0,05)	2,8
	13/0	12/1	5/10	2/13	1/14		
Иммунизированные дозой 25 мкг белка	800	400	200	100	50	222±39 (ρ<0,05)	3
	11/1	10/3	7/8	3/12	0/15		
Иммунизированные дозой 12,5 мкг белка	800	400	200	100	50	187±26 (ρ<0,05)	2,6
	13/0	14/1	7/8	3/12	0/15		
Иммунизированные дозой 6,25 мкг белка	800	400	200	100	50	148±22 (ρ<0,05)	2
	12/0	14/1	10/5	3/12	2/13		
Интактные мыши (контроль)	400	200	100	50	25	73±10	—
	12/0	12/0	8/5	3/12	2/13		

Примечание: \* при сравнении значений опытных групп с контролем

Таблица 2

## Анализ защитных свойств кроличьих сывороток

Группа мышей	Доза заражения, млн. микробных клеток							LD <sub>50</sub> , млн. м. к.*	ИЭ
	Количество мышей павших/выживших								
С введенными сыворотками к OrgL	800	400	200	100	50	25	12,5	348±78 (ρ<0,05)	7,4
	7/3	6/4	2/8	1/9	1/9	0/10	0/10		
С введенной сывороткой интактного кролика	800	400	200	100	50	25	12,5	151±37 (ρ<0,05)	3,2
	10/0	7/3	4/6	3/7	3/7	1/9	1/9		
Интактные (контроль)	400		200	100	50	25	12,5	47±9	—
	10/0	10/0	8/2	3/7	4/6	1/9			

Примечание: \* при сравнении значений опытных групп с контролем

Средние значения подавления роста культуры *P. aeruginosa* составили: 77% при дозе 10<sup>5</sup> КОЕ (число образующих колонии бактерий в 1 мл среды), 80% — при дозе 10<sup>4</sup> КОЕ и 81% — при дозе 10<sup>3</sup> КОЕ. Пул сывороток крови десяти интактных мышей той же партии не обладал существенной антибактериальной активностью

(6, 15 и 21% торможения роста, при тех же посевных дозах культуры *P. aeruginosa*). Полученные результаты свидетельствовали о специфичности защитных свойств рекомбинантных белков.

Для получения гипериммунных сывороток крови к рекомбинантному белку OrgL использовано четыре

кролика, каждому из которых ввели общую дозу антигена 1,5 мг (300 мкг в одной инъекции). При анализе этих сывороток в ИФА выявлено существенное увеличение титров антител, специфичных к рекомбинантному белку OprL (рис. 3), которые были сравнимы с сывороткой к цельноклеточной культуре *P. aeruginosa* штамма PA170015. Эти же сыворотки были исследованы *in vitro* на их способность подавлять рост культуры клеток *P. aeruginosa*. Средние значения подавления роста микроорганизма полученными гипериммунными сыворотками составили: 77,5, 78,5, 66,5 и 79,5% — при посевной дозе  $10^4$  КОЕ и 85, 87, 69,5 и 70,5% — при  $10^5$  КОЕ. Сыворотка интактного кролика не обладала антибактериальной активностью: 5,5% — при  $10^4$  КОЕ и 7% — при  $10^5$  КОЕ.

Далее представляло интерес оценить превентивную активность сывороток крови кроликов иммунных к OprL в сравнении с сывороткой интактного кролика. Сыворотки внутривенно вводили мышам за 2 часа до заражения различными дозами живой вирулентной культуры *P. aeruginosa*.  $LD_{50}$  в группе контрольных животных (не получавших сыворотки) составила 47 млн., а в опытной (мыши с введенным пулом гипериммунных сывороток к рекомбинантному белку OprL) — 348 млн. При введении мышам сыворотки интактного кролика наблюдались, как и следовало ожидать, неспецифичные защитные эффекты ( $LD_{50}$  — 151 млн). Превышение защитного эффекта при введении иммунных сывороток, по сравнению с контрольной, достигало более чем в два раза, что свидетельствовало о иммуногенных свойствах препарата (табл. 2).

### Заключение

Настоящие исследования осуществлялись по отработанной ранее схеме при изучении иммунобиологических свойств рекомбинантного белка OprF [3]. Индекс эффективности его защитных свойств соответствовал 3,7 и являлся сходным с таковым у рекомбинантного белка OprL (3,0) в оптимальной иммунизационной дозе. В экспериментах по пассивной иммунизации, которые подтверждают иммуногенность полученных рекомбинантных свойств, сыворотки крови кроликов иммунных к обоим рекомбинантным белкам вели себя одинаково, увеличивая выживаемость мышей в два раза по сравнению с введением интактных сывороток.

Таким образом, в ходе проведенных исследований получен рекомбинантный белок OprL, характеризующийся высокой протективной активностью, что опреде-

ляет перспективы его использования в составе вакцины против синегнойной инфекции.

*Работа выполнена при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России» на 2007–2012 годы. ГК от 14 февраля 2011 г. № 16.512.11.2067.*

### Литература

1. Беляков В.Д., Ряпис Л.А., Илюхин В.И. Псевдомонады и псевдомонозы. — М.: Медицина, 1990. — 224 с.
2. Гатыпова Е.В., Злыгостев С.А., Калошин А.А. и Михайлова Н.А. Получение рекомбинантного белка I наружной мембраны (OprI) *Pseudomonas aeruginosa* и исследование его антигенных свойств // Ж. микробиологии. — 2008. — № 6 — С. 50–53.
3. Злыгостев С.А., Гатауллин А.Г., Калошин А.А., Михайлова Н.А., Зверев В.В. Исследование защитных свойств белка F наружной мембраны (OprF) *Pseudomonas aeruginosa* // Ж. микробиологии. — 2006. — № 7. — С. 43–47.
4. Макаренко Т.А., Станиславский Е.С. Иммунологическое изучение белков клеточной стенки *Pseudomonas aeruginosa* // Ж. микробиологии. — 1996. — № 2 — С. 7–9.
5. Руднов В.А. Антибиотикотерапия госпитальных инфекций, вызванных *P. aeruginosa* // Русский медицинский журнал. — 2005. — Т. 13. — № 7. — С. 485–490.
6. Страчунский Л.С., Решедько Г.К., Стецюк О.У., Андреева А.С., Щебников А.Г. Сравнительная активность антисинегнойных антибиотиков в отношении нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных в отделениях реанимации и интенсивной терапии России // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2003. — № 5. — С. 35–46.
7. Hancock R.E., Siehnel R., Martin N. Outer membrane proteins of *Pseudomonas* // Mol. Microbiol. — 1990. — Vol. 4(7). — P. 1069–1075.
8. Lee N.G., Jung S.B., Ahn B.Y., Kim Y.H., Kim J.J., Kim D.K., Kim I.S., Yoon S.M., Nam S.W., Kim H.S., Park W.J. Immunization of burn-patients with a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein vaccine elicits antibodies with protective efficacy // Vaccine. — 2000. — Vol. 18. — P. 1952–1961.
9. Mansouri E., Blome-Eberwein S., Gabelsberger J., Germann G., von Specht B.U. Clinical study to assess the immunogenicity and safety of a recombinant *Pseudomonas aeruginosa* OprF-OprI vaccine in burn patients. // FEMS Immunology Medical Microbiology. — 2003. — Vol. 37. — P. 161–166.
10. Sambrook J.F. and Russell D.W. Molecular Cloning. — Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

---

## **PREPARATION OF RECOMBINANT OUTER MEMBRANE PROTEIN L OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA AND STUDY OF ITS IMMUNOGENIC AND PROTECTIVE PROPERTIES**

N.A. MIKHAILOVA, A.A. KALOSHIN

*I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera RAMS, Moscow*

In order to develop a candidate vaccine preparation we used the gene encoding the of the outer membrane protein L *Pseudomonas aeruginosa*. The sequence coding for a protein OprL, cloned into plasmid pQE-30 and expressed in *Escherichia coli* M15. The recombinant protein for animal experiments purified by affinity chromatography columns with Ni-NTA agarose. Rabbits and mice immunized with recombinant protein. There was a significant increase in titers of specific IgG antibodies in the immunized animals. Sera of immunized animals possessed the specific antibacterial properties in vitro. In evaluating the preventive activity of rabbit sera to protein OprL shown a protective effect compared with sera from intact animals. The index of the effectiveness of immune sera was approximately two times higher than in sera from intact rabbits. Protective properties of the recombinant protein assessed after double immunization of mice. When using immunization doses of 25 micrograms set the highest performance index (3.0).

*Keywords: Pseudomonas aeruginosa, outer membrane protein L (OprL).*

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭТИЛОВОГО СПИРТА БИОСЕНСОРОМ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК *GLUCONOBACTER* В ОБРАЗЦАХ, СОДЕРЖАЩИХ УКСУСНУЮ КИСЛОТУ

А.Н. РЕШЕТИЛОВ\*, А.Е. КИТОВА

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино

При анализе параметров биосенсоров на основе бактерий *Gluconobacter* не рассматривалась детекция этилового спирта при высоких отношениях концентраций «кислота/этанол» ( $\alpha$ ). Вместе с тем эта задача является актуальной, например, при контроле получения уксусной кислоты из этанола. При этом отношение  $\alpha$  достигает величины  $\approx 100$  единиц, на фоне которого следует измерять концентрацию спирта, служащую индикатором конечной стадии ферментационного процесса. В данной работе исследовали влияние рН на стабильность измерения этанола в кислой среде. Показали, что оптимальным вариантом для измерений является использование 30 мМ фосфатного буфера с рН в диапазоне от 6 до 7 единиц (исследованы цитратный, трис-малеатный, натрий-фосфатный буферы). Сенсор позволял определять этиловый спирт в диапазоне 0,0125–2,00 мМ (0,00007–0,01%). Пробы, содержащие уксусную кислоту и спирт в концентрациях, соответствующих окончанию ферментационного процесса (принято соответственно 9 и 0,1%), при выполнении измерений разводили в 80 раз. Точность измерения содержания спирта в пробах составляла 5–6%. Результаты исследования являются важными для выполнения мониторинга процесса получения уксусной кислоты, поскольку представляют метод отслеживания всех его стадий.

**Ключевые слова:** *Gluconobacter*, алкогольоксидаза, биосенсор, этанол, уксусная кислота.

## Введение

На начальной стадии ферментационного процесса производства уксусной кислоты из этанола в ферментере находится максимальное количество этилового спирта ( $\approx 10\%$ ), которое снижается в процессе роста содержания уксусной кислоты. Снижение концентрации этилового спирта до определенного уровня свидетельствует о завершении процесса [2].

Описание реального ферментационного процесса (моделирование, измерение и контроль) получения уксусной кислоты квазинепрерывным способом с использованием штаммов *Acetobacter* приведено в работе [5]. Для контроля ферментационного процесса использовались такие параметры, как концентрация уксусной кислоты, этилового спирта и оптическая плотность клеточной

суспензии. Согласно приведенным в работе данным, убыль этилового спирта и накопление уксусной кислоты имели зависимости, близкие к линейным. При этом происходило взаимозависимое накопление уксусной кислоты и убыль этанола.

Так, исходная концентрация этанола, равная 30 г/л, в течение 20–25 ч падала до 2 г/л, а начальный уровень уксусной кислоты увеличивался от 60 до 98 г/л. При этом отношение концентраций «кислота/этанол», обозначенное нами как  $\alpha$ , составляло ориентировочно 2 и 50 единиц для начала и окончания процесса, соответственно. Отметим, что для процесса получения уксусной кислоты актуален мониторинг стадий ферментации. Их отслеживание в конечном итоге определяет стадию завершения и снижает стоимость продукции. В указанной работе для определения содержания этилового спирта использовали газовый сенсор, уксусную кислоту определяли неспецифическим сенсором, измеряя рН среды.

Применение бактерий *Gluconobacter* в биосенсорах для детекции этилового спирта описано в ряде работ. В работе [9] биосенсор на основе *Gluconobacter oxydans* был использован для регистрации этилового спирта и глюкозы, глюкозу регистрировали колориметрически. Этиловый спирт определяли по разнице показаний

© 2011 г. Решетиллов А.Н., Китова А.Е.

\* **Автор для переписки:**

Решетиллов Анатолий Николаевич, д.х.н., профессор, заведующий лабораторией биосенсоров Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН 142290 Московская обл., г. Пушкино, проспект Науки, 5  
Тел.: (9467) 73-16-66  
Факс: (495) 956-33-70  
E-mail: anatol@ibp.m.pushchino.ru

биосенсора и колориметрического метода. В работе [6] был рассмотрен микробный биотопливный элемент на основе смеси культур *Acetobacter aceti* и *Gluconobacter roseus*, для которого в качестве топлива использовали некондиционное вино, этанол, глюкозу и ацетат. Наибольший КПД тока был получен при использовании некондиционного вина. Исследовали влияние рН на параметры микробного биотопливного элемента: измерения проводили как при рН 7, так и при рН 4. При рН 4 величина тока окисления, зарегистрированного при снятии вольт-амперных характеристик, имела более низкие значения, чем при рН 7.

Цель настоящей работы состояла в оценке возможности измерения биосенсором на основе бактерий *G. oxydans* этилового спирта в образцах, содержащих уксусную кислоту. Предполагалось, что данный тест может быть полезен для контроля получения уксусной кислоты из этанола и определения конечной стадии процесса, которая характеризуется значительным снижением концентрации спирта в ферментационной среде.

Несмотря на разведение при измерениях исходной пробы, содержащей уксусную кислоту, неизбежно происходит изменение рН базового раствора, которое может повлиять на сигнал биосенсора. Всесторонний теоретический расчет модели, включающий в себя изменения рН и реакцию биосенсора, в этом процессе представляется сложным, в силу чего была использована экспериментальная проверка.

Особое внимание в исследовании обращали на случай, имитирующий конечную стадию получения уксусной кислоты, когда содержание этилового спирта в пробе является низким (падает до 1–0,1%), а концентрация уксусной кислоты — высокой (порядка 10%). Другая особенность данной работы состояла в использовании бактерий рода *Gluconobacter* как основы рецепторного элемента биосенсора. Бактерии данного рода не окисляют ацетат и другие кислоты до  $\text{CO}_2$  и воды [4]. Эта особенность является одной из характерных черт, отличающих род *Gluconobacter* от рода *Acetobacter*, в связи с чем они и были выбраны для разработки биосенсора.

В задачи исследования входили выбор типа буферного раствора и оценка его влияния на стабильность биорецептора, а также исследование параметров сенсора при использовании оптимального типа буфера. В качестве приближения к практической стороне вопроса для измерений использовали коммерческие растворы уксусной кислоты. В публикациях по данной теме вопрос в предлагаемой постановке не исследовался.

## Материалы и методы

Штамм *Gluconobacter oxydans* ВКМ В-1280 (получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов) выращивали на питательной среде, содержащей (г/л): сорбит — 100, дрожжевой экстракт — 10. Клетки выращивали в течение 18 ч в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, содержащих 100 мл ростовой среды при перемешивании на качалке (200 об./мин., 28 °С). Биомассу отделяли центрифугированием при 10000 г в течение 5 мин. и отмывали дважды натрий-фосфатным буфером (30 мМ, рН 6,6) [8].

Для анализа этилового спирта был использован микробный биосенсор на основе клеток *Gluconobacter oxydans* ВКМ В-1280 и ферментный сенсор на основе алкогольоксидазы (выделена из *Hansenula polymorpha* NCYC 495 ln, активность 14 ед/мг) [1].

При формировании микробного биосенсора иммобилизацию клеток осуществляли их физической сорбцией на фильтрах из стекловолокна (тип GF/A, Whatman) [7]. Для этого 1 мг биомассы наносили на фильтр и подсушивали при комнатной температуре в течение 20 мин. (использовали замороженную биомассу, при подготовке к иммобилизации предварительно клетки размораживали).

Алкогольоксидазу (АО) иммобилизовали в слое ДЭАЭ-декстрана на нитроцеллюлозных мембранах, активированных бензохиноном [3].

Биорецептор (иммобилизованные на мембранах ферменты или клетки) размером 3×3 мм<sup>2</sup> фиксировали на измерительной поверхности кислородного электрода типа Кларка (ООО «Кронас», Россия). Скорость перемешивания растворов магнитной мешалкой составляла 400 об./мин. Измерения проводили в открытой кювете (объем 2 мл) с помощью гальваностата-потенциостата IPC2L (ООО «Кронас», Россия), совмещенного с персональным компьютером. В кювету вносили пробу (объем 100 мкл) с нужной концентрацией. Разбавление пробы в кювете составляло 1:20. Измерения проводились при комнатной температуре. В качестве базового раствора использовали 30 мМ натрий-фосфатный буфер рН 6,6. Регистрируемым параметром являлась максимальная скорость изменения сигнала (нА/с).

Для исследования рН-зависимости применяли буферные растворы: натрий-фосфатный, цитратный (по Макилвейну) и буфер, содержащий трис(гидроксиэтил)аминометан-малеат. Молярность буферных растворов составляла 30 мМ.

Для анализа использовали пробы, моделирующие основные этапы ферментационного процесса: 10%

этанола — начало процесса; 5% этанола в 5% уксусной кислоте — середина процесса; 1% этанола в 9% уксусной кислоте и 0,1% этанола в 9% уксусной кислоте — окончание процесса.

### Результаты и обсуждение

**Выбор типа буферного раствора.** Были использованы различные типы буферов (натрий-фосфатный, буфер Макилвейна, трис-малеатный). Предположили, что компоненты буферных растворов могут по-разному влиять на устойчивость клеток к изменениям рН. Концентрация этанола и уксусной кислоты в исходной пробе составляла 0,1% (17 мМ) и 9% (1,5 М), соответственно. Указанное содержание уксусной кислоты соответствует минимальной концентрации уксусной кислоты в ферментационной среде, при которой процесс прекращают [2]. При измерении пробу разбавляли в 80 раз.

Результаты изучения влияния типа буфера на стабильность клеток приведено на рисунке 1. Диапазон исследованных значений рН для цитратного буферного раствора (по Макилвэйну) составлял 3,2–7 (кривая 1). Отклики биосенсора были стабильны в диапазоне рН от 3,2 до 6,4. При рН 7 ошибка измерения превышала 10%.

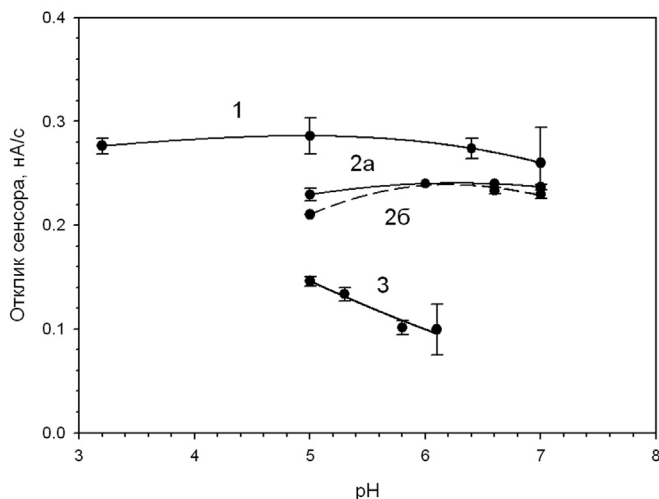


Рис. 1. Зависимости ответов биосенсора на основе *G. oxydans* от рН буферного раствора (1 — цитратный буфер; 2(а, б) — натрий-фосфатный буфер; 3 — трис-малеатный буфер)

При использовании натрий-фосфатного буфера биорецептор был стабилен в диапазоне значений рН 5–7 при анализе проб этилового спирта (кривая 2а). При анализе проб, содержащих этиловый спирт и уксусную кислоту (кривая 2б), ответы сенсора были стабильны в диапазоне рН 6–6,6.

При использовании буферного раствора, содержащего трис-малеат, диапазон исследованных значений рН составлял 5–6,1 (кривая 3). При увеличении величины рН наблюдали снижение ответов сенсора.

Тип буферного раствора оказывал влияние на величину ответа сенсора. Так, при использовании цитратного буферного раствора получена наибольшая величина ответа сенсора. Однако при исследовании стабильности сенсора в цитратном буфере в течение первых 6 ч наблюдали снижение ответов сенсора, которое не было характерным при использовании других типов буфера. В качестве оптимального базового раствора был выбран натрий-фосфатный буферный раствор, который применяли в дальнейших экспериментах.

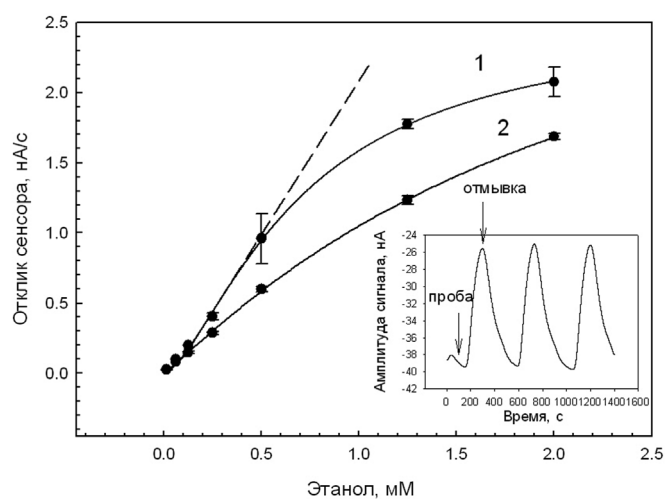


Рис. 2. Градуировочные зависимости биосенсора на основе штамма *G. oxydans* ВКМ В-1280 для детекции этилового спирта (1) и для детекции этилового спирта в присутствии уксусной кислоты (2); пунктиром показан максимальный наклон касательной на начальном участке кривой. На вставке дан типичный вид откликов сенсора (концентрация этанола 0,5 мМ)

### Исследование основных параметров сенсора.

Основным аналитическим параметром биосенсора является градуировочная зависимость. Для ее построения в измерительную кювету вносили различные концентрации этилового спирта. На рисунке 2 представлена градуировочная зависимость биосенсора на основе клеток штамма *G. oxydans* ВКМ В-1280 (кривая 1). Диапазон определяемых концентраций этилового спирта составил 0,0125–2,00 мМ (0,00007–0,01%) (приведено конечное содержание этанола в измерительной кювете). Отклики сенсора были сняты в 30 мМ натрий-фосфатном буферном растворе с рН 6,6. Максимальная чувствительность в области линейного диапазона составила 1,2 (нА/с)/мМ, линейный диапазон детекции — 0,0125–0,5

мМ (0,00007–0,003%). Кривая (2) представляет собой градуировочную зависимость для проб этилового спирта, содержащих уксусную кислоту в качестве фоновой концентрации (0,11% (18,3 мМ) — концентрация в кювете, концентрация в исходной пробе составляла 9%). Линейный диапазон составлял 0,0125–1,25 мМ (0,00007–0,007%) этанола, чувствительность в области линейного диапазона 1,2 (нА/с)/мМ.

Для биорецептора на основе клеток штамма *G. oxydans* была проведена оценка воспроизводимости ответов на пробы, содержащие этиловый спирт и уксусную кислоту (проба содержала 0,025% (4,35 мМ) этанола и 2,4% (400 мМ) уксусной кислоты, разбавление пробы в кювете происходило в 20 раз). Коэффициент вариации сенсора — 6%. Измерения проводили в натрий-фосфатном буферном растворе с концентрацией 30 мМ. Время ответа — 120 с. Сенсор позволял выполнять 6 измерений в час.

**Анализ проб с разным содержанием спирта в растворе уксусной кислоты, моделирующих процесс получения пищевой уксусной кислоты.** В производстве уксусной кислоты для оптимального проведения технологического процесса нужно иметь информацию о содержании этанола, поскольку его снижение до определенного конечного уровня (0,1%) свидетельствует о завершении процесса.

Был проведен анализ проб, моделирующих получение уксусной кислоты на различных этапах технологического процесса.

Величины откликов сенсора на пробы, моделирующие этапы ферментационного процесса, представлены в таблице 1. При анализе пробы, содержащей 9% (1,5 М) уксусной кислоты (концентрация в кювете 0,11% (18,3 мМ)) и 0,1% (17 мМ) этилового спирта (0,00125% (0,22 мМ) в кювете), рН исходного буферного раствора, равный 6,6, снижался на единицу. Для анализа последующих проб разбавление увеличивалось на порядок, что практически не оказывало влияния на рН буферного раствора.

Таким образом, для оценки этилового спирта в анализируемых пробах необходимо их разбавление в 80 (конечное разбавление в кювете) и более раз. При использовании такого разбавления рН базового буферного раствора изменяется незначительно.

**Анализ этилового спирта в реальных образцах.** Проведена оценка остаточного содержания этилового спирта в образцах пищевого уксуса, полученного микробиологическим способом (табл. 2). Коэффициент корреляции данных, полученных при использовании микробного и ферментного на основе алкогольоксидазы сенсоров, составил 0,98.

Таблица 1

### Зависимость откликов сенсора от концентрации этилового спирта в модельной пробе

Проба	рН проб	Разбавление проб буфером	рН проб в измерительной кювете	Отклик сенсора, нА/с
0,1% этанола в 9% уксусной кислоте	2,4	80 раз	5,5	0,200±0,005
1% этанола в 9% уксусной кислоте	2,4	800 раз	6,6	0,206±0,004
5% этанола в 5% уксусной кислоте	2,5	4000 раз	6,6	0,202±0,009
10% этанол	5,0	8000 раз	6,6	0,200±0,019

Таблица 2

### Содержание остаточного этилового спирта в уксусе

Образец	Этанол			
	<i>G. oxydans</i>		Алкогольоксидаза	
	мМ	%	мМ	%
Яблочный уксус («Егорье»)	12,0±0,7	0,069	11,9±1,1	0,068
Яблочный уксус («Абрико»)	10,9±1,0	0,063	11,7±0,8	0,067
Виноградный уксус («Балтимор»)	16,6±1,2	0,095	14,9±1,1	0,085

### Заключение

Показано, что фактически высокие степени разведения базовым буферным раствором исходной пробы, моделирующей состав ферментационной среды при получении уксусной кислоты, нивелируют низкие значения рН. Концентрация спирта при данном разбавлении соответствует области линейного диапазона биосенсора на основе клеток *Glucanobacter oxydans*. Незначительные изменения рН, вызванные присутствием уксусной кислоты, не влияют на результаты измерения при использовании данного типа биосенсора. Исследованные буферные системы оказывали различное влияние на параметры биосенсора, на основании чего был выбран оптимальный буферный раствор (натрий-фосфатный).

Полученные данные свидетельствуют о возможности мониторинга процесса уксусной кислоты как микробным, так и ферментным биосенсорами. Ферментный биосенсор, обладающий более высокой селективностью по сравнению с микробным, может быть использован в качестве контрольного метода оценки общего содержания спиртов.

Работа выполнялась при финансовой поддержке ФЦП Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК: 16.512.11.2126) и гранта РФФИ (10-07-00712-а).

## Литература

1. Ашин В.В., Торопова И.А., Кувичкина Т.Н., Решетилов А.Н. Сравнительная характеристика алкогольоксидазы из метилотрофных дрожжей *Pichia methanolica* и *Hansenula polymorpha* / Тезисы докладов III Съезда биофизиков России, Воронеж, 2004. — Воронежский госуниверситет, 2004. — С. 5.
2. Бекер М.Е. Введение в биотехнологию. — М.: Пищевая промышленность, 1978. — С. 143–145.
3. Зайцев М.Г., Ашин В.В., Решетилов А.Н. Новый метод иммобилизации метилотрофных клеток и алкогольоксидазы, выделенной из них, для биосенсорной детекции низших спиртов / Актуальные аспекты современной микробиологии: Сборник тезисов III Международной молодежной школьконференции, Москва, 2007. — ИНМИ РАН, 2007. — С. 35.
4. Луста К.А., Решетилов А.Н. Физиолого-биохимические особенности *Gluconobacter oxydans* и перспективы использования в биотехнологии и биосенсорных системах // Прикл. биохимия и микробиология. — 1998. — Т. 34. — Р. 339–353.
5. Hekmat D., Vortmeyer D. Measurement, control, and modeling of submerged acetic acid fermentation // J. Ferment. Bioeng. — 1992. — Vol. 73. — N 1. — Р. 26–30.
6. Rengasamy K., Berchmans S. Simultaneous degradation of bad wine and electricity generation with the aid of the coexisting biocatalysts *Acetobacter aceti* and *Gluconobacter roseus* // Bioresource Technology. — 2012. — Vol. 104. — Р. 388–393.
7. Reshetilov A.N., Iliasov P.V., Donova M.V. et al. Evaluation of a *Gluconobacter oxydans* whole cell biosensor for amperometric detection of xylose // Biosensors and Bioelectronics. — 1997. — Vol. 12. — N 3. — Р. 241–247.
8. Tkac J., Navratil M., Sturdik E., Gemeiner P. Monitoring of dihydroxyacetone production during oxidation of glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* cells with an enzyme biosensor // Enzyme and Microbial Technology. — 2001. — Vol. 28. — N 4–5. — Р. 383–388.
9. Valach M., Katrluk J., Sturdik E., Gemeiner P. Ethanol *Gluconobacter* biosensor designed for flow injection analysis. Application in ethanol fermentation off-line monitoring // Sensors and Actuators, B: Chemical. — 2009. — Vol. 138. — Р. 581–586.

## DETECTION OF ETHANOL BY BIOSENSOR BASED ON IMMOBILIZED MICROBIAL CELLS *GLUCONOBACTER* IN SAMPLES CONTAINING ACETIC ACID

A.N. RESHETILOV, A.E. KITOVA

*G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino*

Having analyzed parameters of a *Gluconobacter* bacteria-based biosensor, the possibility of detecting ethanol has not been considered at high concentrations of «acid/ethanol» ratio ( $\alpha$ ). At the same time this task is topical, for instance, during the monitoring of acetic acid production from ethanol. In this case,  $\alpha$  ratio reaches the value of  $\approx 100$  units but the ethanol concentration as an indicator of the final stage of the process should be measured. The effect of pH on the stability of ethanol measurement in acid medium has been studied. It has been shown that the use of 30 mM phosphate buffer, pH in the range from 6 to 7 (citrate, Tris-maleate, sodium-phosphate buffers have been investigated) is optimum. A biosensor provides the possibility to detect ethanol in the range from 0.0125–2.00 mM (0.00007–0.01%). Samples which contain acetic acid and ethanol at concentrations corresponding to the completion of fermentation process (accepted, respectively, 9 and 0.1%) were diluted by 80 times for measurement procedure. The measurement accuracy of ethanol content in samples was 5–6%. The results of the study are important for monitoring the process of acetic acid production since they represent the technique of monitoring all of process stages.

*Keywords:* *Gluconobacter*, alcohol oxidase, biosensor, ethanol, acetic acid.



## НОВАЯ МЕТИЛЗАВИСИМАЯ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ДНК-ЭНДОНУКЛЕАЗА MteI РАСЩЕПЛЯЕТ ДЕВЯТИНУКЛЕОТИДНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ 5'-G(5MC)G(5MC)NG(5MC)GC-3'/3'-CG(5MC)GN(5MC)G(5MC)G-5'

В.А. ЧЕРНУХИН\*, Д.А. ГОНЧАР, Е.В. КИЛЕВА, В.А. СОКОЛОВА, Л.Н. ГОЛИКОВА,  
В.С. ДЕДКОВ, Н.А. МИХНЕНКОВА, С.Х. ДЕГТЯРЕВ

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Новая метилзависимая сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза MteI выделена из штамма бактерии *Microbacterium testaceum* 17В. Фермент узнает С5-метилованную последовательность ДНК и не гидролизует неметилованную ДНК. MteI является первой из метилзависимых сайт-специфических ДНК-эндонуклеаз, узнающих протяженный сайт; при этом активность фермента зависит от числа 5-метилцитозинов и их положения в узнаваемой последовательности. MteI расщепляет сайт 5'-G(5mC)G(5mC)NG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GN(5mC)G(5mC)G-5' как указано стрелками, и эта последовательность является минимальным сайтом узнавания. Активность фермента существенно возрастает при замене в минимальном сайте узнавания 5'-GC-3' динуклеотидов на 5'-G(5mC)-3' динуклеотиды и появлении дополнительных 5'-G(5mC)-3' динуклеотидов на 5'-концах нонануклеотида в обеих цепях ДНК. Благодаря своей способности расщеплять только протяженные метилированные последовательности ДНК фермент MteI может найти практическое применение в молекулярно-биологических и эпигенетических работах.

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

### Введение

Метилзависимыми сайт-специфическими ДНК-эндонуклеазами (МСС ДНК-эндонуклеазами) называют ферменты, которые узнают и расщепляют определенные метилированные последовательности ДНК и не гидролизуют немодифицированную ДНК. По своим свойствам эти ферменты похожи на хорошо изученные эндонуклеазы рестрикции и так же, как рестриктазы, они не требуют кофакторов помимо ионов  $Mg^{2+}$ .

В настоящее время известно несколько МСС ДНК-эндонуклеаз, узнающих и расщепляющих ДНК по последовательностям, содержащим 5-метилцитозин. В частности, к ним относится ДНК-эндонуклеаза GluI, которая гидролизует метилированную последовательность ДНК 5'-R(5mC)GY-3', где R — пурин, Y — пиримидин [3].

Различные МСС ДНК-эндонуклеазы могут узнавать сходные последовательности ДНК, отличающиеся только узором метилирования. Так, ферменты BlnI, BsiI, PkrI и GluI узнают и расщепляют С5-метилованную нуклеотидную последовательность 5'-GCNGC-3', однако первые два из них способны расщеплять эту последовательность при наличии в ней хотя бы двух 5-метилцитозинов, тогда как в случае PkrI и GluI для эффективного гидролиза требуется 3 и 4 метилированных основания, соответственно [4–7].

В данной работе описана новая МСС ДНК-эндонуклеаза MteI, узнающая и расщепляющая девятинуклеотидную метилированную последовательность ДНК.

### Материалы и методы

#### Препараты ферментов и субстраты для них.

Для экспериментов использовали препараты ДНК фагов  $\lambda$ , T7 и различных С5-метилованных плазмид, которые были сконструированы ранее [3, 6, 7], или в данной работе, как описано ниже. Кроме того, использовали эндонуклеазы рестрикции, T4 ДНК-лигазу, T4 полинуклеотидкиназу, ДНК-метилтрансферазы HspAI

© 2012 г. Чернухин В.А., Гончар Д.А., Килева Е.В., Соколова В.А., Голикова Л.Н., Дедков В.С., Михненко Н.А., Дегтярев С.Х.

\* Автор для переписки:

Чернухин Валерий Алексеевич

630117 Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2/12

E-mail: valera@sibenzyme.ru

и Fsp4HI и буферные растворы для них производства НПО «СибЭнзим» (Россия).

В качестве маркера молекулярных масс ДНК при получении электрофореграмм в агарозных гелях использовали ДНК-маркер 1 kb («СибЭнзим», Россия).

**Выращивание штамма-продуцента.** Для получения биомассы клетки штамма-продуцента подрачивали в чашке Петри на агаризованной среде LB (1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl, pH 7,5, 0,5% агар-агар) в течение ночи при 30 °С. Свежевыращенные колонии переносили стерильной бактериологической петлей в колбы, содержащие жидкую питательную среду LB и культивировали на качалках при 30 °С при перемешивании – 150 об./мин. до достижения стационарной фазы роста. Клетки осаждали центрифугированием при 5000 об./мин. при 4 °С на центрифуге «Beckman» (США) в роторе JA-10.

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

- буфер А – 10 mM Трис-НСl pH 7,6; 0,1 mM ЭДТА и 7 mM 2-меркаптоэтанол;
- буфер Б – 10 mM К-фосфат pH 7,2; 0,1 mM ЭДТА и 7 mM 2-меркаптоэтанол.

**Экстрагирование.** 20 г биомассы суспендировали в 60 мл буфера А с добавлением 0,2 М NaCl, 1 mM фенилметилсульфонилфторида, 0,1 мг/мл лизоцимома. Клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе Soniprep 150 («MSE», Англия) с диаметром адаптера 2 см. Обработку проводили при амплитуде 20 мкм 8 раз по 1 мин. с интервалами на охлаждение в ледяной бане по 1 мин. Экстракт осветляли центрифугированием при 15000 об./мин. в течение 30 мин в роторе JA-20 на центрифуге J2-21 («Beckman», США).

**Хроматография на фосфоцеллюлозе.** Экстракт наносили на колонку объемом 30 мл, уравновешенную буфером А с 0,2 М NaCl, и промывали двумя колоночными объемами буфера А с 0,2 М NaCl. Сорбированный материал вымывали градиентом NaCl от 0,2 до 1 М объемом 300 мл. В итоге получили 50 фракций, из которых отобрали и объединили фракции с 20-й по 30-ю, содержащие целевую активность.

**Хроматография на гидроксилпатите.** Объединенные фракции наносили на колонку с гидроксилпатитом объемом 4 мл, уравновешенную буфером Б, и промывали восемью мл буфера Б. Сорбированный материал вымывали линейным градиентом буфера Б от 0,01 М до 0,2 М К-фосфата объемом 150 мл. Было получено 150

фракций, из которых объединяли фракции с 10 по 18, содержащие целевую активность.

**Хроматография на гепарин-сефарозе.** Объединенные фракции наносили на колонку с 4 мл гепарин-сефарозы, уравновешенную буфером А с 0,1 М NaCl, и промывали восемью мл 0,1 М NaCl в буфере А. Сорбированный материал вымывали буфером А с линейным градиентом NaCl от 0,1 М до 0,6 М объемом 150 мл. Всего было получено 40 фракций, из которых объединяли фракции с 15 по 23, содержащие целевую активность.

**Концентрирование и хранение препарата.** Полученную объединенную фракцию, содержащую целевую активность, диализовали в течение 20 ч против 300 мл буфера А с 55% глицерином, 0,25 М NaCl и хранили при -20 °С.

**Конструирование плазмид, содержащих С5-метилованную ДНК.** С целью определения субстратной специфичности и активности MteI мы сконструировали ряд плазмид, содержащих в своем составе гены ДНК-метилтрансфераз HspAI и Fsp4HI.

**Конструирование С5-метилованных плазмид, содержащих ген ДНК-метилтрансферазы HspAI.** Все новые плазмиды, содержащие метилазу HspAI, были созданы на основе плазмиды pHspAI (4118 п.н.), которая была ранее получена путем лигирования вектора pUC19/EcoRI и фрагмента геномной ДНК бактериального штамма *Haemophilus species* AI, включающего ген ДНК-метилтрансферазы HspAI [1=3]. Штамм *E. coli*, несущий эту плазмиду, содержит активную метилазу HspAI, метилирующую первый цитозин в положении С5 на обеих цепях последовательности 5'-GCCG-3' с образованием метилированной двуцепочечной последовательности 5'-G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G-5'.

В ходе данной работы мы встраивали в ДНК плазмиды pHspAI путем лигирования различные олигонуклеотидные дуплексы по сайтам рестрикции PstI и Psp124BI.

В результате были получены четыре новые плазмиды, несущие дополнительные метилированные участки, образованные в результате модификации последовательностей встроенных олигонуклеотидных дуплексов метилазой HspAI.

1) pHspAI2 была получена путем встраивания фрагмента ДНК, образованного из следующих синтетических олигонуклеотидов:

- G1-1: 5'-c ggt agc gcg cgc tcc tct aga gtc gac ctg ca-3'
- G1-2: 5'-ggtc gac tct aga gga gcg cgc gct acc gag ct-3'

В результате встраивания данного дуплекса в плазмиде  $\rho\text{HspAI2}$  появился новый метилированный сайт:

5'-CGGTAG(5mC) G(5mC)G(5mC) G CTCCTCTAGAGTCGACCTGCA-3'  
3'-GCCATC G(5mC)G(5mC)G(5mC)GAGGAGATCTCAGCTGGACGT-5'

2)  $\rho\text{HspAI4}$  была получена путем встраивания фрагмента ДНК, образованного из следующих синтетических олигонуклеотидов:

Gl-3: 5'-c ggt agc gcag cgc tcc tct aga gtc gac ctg ca-3'

Gl-4: 5'-ggtc gac tct aga gga gcg ctgc gct acc gag ct-3'

В результате встраивания данного дуплекса в плазмиде  $\rho\text{HspAI4}$  появился новый метилированный сайт:

5'-CGGTAG(5mC) G CAG(5mC) G CTCCTCTAGAGTCGACCTGCA-3'  
3'-GCCATC G(5mC)GTC G(5mC)GAGGAGATCTCAGCTGGACGT-5'

3)  $\rho\text{HspAI10}$  была получена путем встраивания фрагмента ДНК, образованного из следующих синтетических олигонуклеотидов:

Gl-9: 5'-t ggt agcgc gcag cgcgc tcc tct aga gtc gac ctg ca-3'

Gl-10: 5'-ggtc gac tct aga gga gcgctc ctgc gcgct acc aag ct-3'

В результате встраивания данного дуплекса в плазмиде  $\rho\text{HspAI10}$  появился новый метилированный сайт:

5'-TGGTAG(5mC)G(5mC)G CAG(5mC)G(5mC)G CTCCTCTAGAGTCGACCTGCA-3'  
3'-ACCATC G(5mC)G(5mC)GTC G(5mC)G(5mC)GAGGAGATCTCAGCTGGACGT-5'

4)  $\rho\text{HspAI12}$  была получена путем встраивания фрагмента ДНК, образованного из следующих синтетических олигонуклеотидов:

Gl-11: 5'-t ggt agcgc gcag cgc tcc tct aga gtc gac ctg ca-3'

Gl-12: 5'-ggtc gac tct aga gga gcg ctgc gcgct acc aag ct-3'

В результате встраивания данного дуплекса в плазмиде  $\rho\text{HspAI12}$  появился новый метилированный сайт:

5'-TGGTAG(5mC)G(5mC)G CAG(5mC)G CTCCTCTAGAGTCGACCTGCA-3'  
3'-ACCATC G(5mC)G(5mC)GTC G(5mC)GAGGAGATCTCAGCTGGACGT-5'

**Конструирование С5-метилированных плазмид, содержащих ген ДНК-метилтрансферазы Fsp4HI.** При конструировании новых субстратов мы также использовали плазмиды  $\rho\text{Fsp4HI2}$  и  $\rho\text{Fsp4HI3}$  [6], которые содержат ген метилтрансферазы Fsp4HI, метилирующей первый цитозин в последовательности 5'-GCNGC-3' с образованием последовательности 5'-G(5mC)NGC-3'/3'-CCN(5mC)G-5'. Для получения новых субстратов мы встраивали в плазмиду  $\rho\text{Fsp4HI2}$  путем лигирования олигонуклеотидные дуплексы по сайтам рестрикции Bsp19I и HindIII. В результате были сконструированы три плазмиды, несущие дополнительные метилированные участки, образованные

в результате метилирования встроенных олигонуклеотидных дуплексов метилазой Fsp4HI.

1) Плазмиды  $\rho\text{Fsp4HI4}$  была получена путем встраивания фрагмента ДНК, образованного из синтетических олигонуклеотидов:

Fsp3: 5'-cat gtg ccg ccg ccgctcga ttc taga-3'

Fsp4: 5'-agct tct aga att cga gcg gcg gca-3'

В результате встраивания данного дуплекса в  $\rho\text{Fsp4HI4}$  появился новый метилированный сайт:

5'-CATGTG(5mC)C G(5mC)C G(5mC)C G CTCGAATTCTAGA-3'  
3'-GTACAC G G(5mC)G G(5mC)G G(5mC)GAGCTTAAGATCT-5'

2)  $\rho\text{Fsp4HI6}$  была получена путем встраивания фрагмента ДНК, образованного из синтетических олигонуклеотидов:

Fsp5: 5'-cat gtg ccg cag ccg ctcga ttc taga-3'

Fsp6: 5'-agct tct aga att cga gcg gct gcg gca-3'

В результате встраивания данного дуплекса в  $\rho\text{Fsp4HI6}$  появился новый метилированный сайт:

5'-CATGTG(5mC)C G(5mC)A G(5mC)C G CTCGAATTCTAGA-3'  
3'-GTACAC G G(5mC)G T(5mC)G G(5mC)GAGCTTAAGATCT-5'

3)  $\rho\text{Fsp4HI8}$  была получена путем встраивания фрагмента ДНК, образованного из синтетических олигонуклеотидов:

Fsp7: 5'-cat gtg ctg cag cag ctcga ttc taga-3'

Fsp8: 5'-agct tct aga att cga gct gct gca-3'

В результате встраивания данного дуплекса в  $\rho\text{Fsp4HI8}$  появился новый метилированный сайт:

5'-CATGTG(5mC)T G(5mC)A G(5mC)A G CTCGAATTCTAGA-3'  
3'-GTACAC G A(5mC)G T(5mC)G T(5mC)GAGCTTAAGATCT-5'

**Сайт-специфический гидролиз ДНК эндонуклеазой MteI** проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкг ДНК в SE-буфере «Y» (33 mM Три-ацетат pH 7,9; 10 mM Mg-ацетат; 66 mM K-ацетат; 1 mM дитиотреитол) при 48 °C. Продукты реакции гидролиза разделяли путем электрофореза в буфере TAE в 20% полиакриламидном геле, содержащем 7M мочевины, или в 1% агарозном геле.

**Определение активности препарата фермента.** За одну единицу активности MteI мы принимали такое минимальное количество фермента, которое необходимо для полного гидролиза единственного сайта узнавания в 1 мкг ДНК плазмиды  $\rho\text{HspAI10}/\text{DriI}+\text{M.Fsp4HI}$  в 20 мкл реакционной смеси, содержащей SE-буфере «Y» при 48 °C за 60 минут.

**Для определения первичной структуры фрагмента гена 16S РНК** проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с помощью следующих праймеров:

16S-direct 5'-AGAGTTTGATC(5mC)TGGCTCA-3'  
16S-reverse 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

Первичная структура полученного ПЦР-продукта определялась с помощью секвенатора Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Mte3: 5'-CCGTACTTTG(5mC)G(5mC)AG(5mC)G(5mC)TTGATTCCC-3'  
Mte4: 5'-GGGAATCAAG(5mC)G(5mC)TG(5mC)G(5mC)AAAGTACGG-3'  
Glu7: 5'-CCGTACTTTG(5mC)G(5mC)GG(5mC)G(5mC)TTGATTCCC-3'  
Glu8: 5'-GGGAATCAAG(5mC)G(5mC)CG(5mC)G(5mC)AAAGTACGG-3'

Одну из цепей дуплекса метили по 5'-концу радиоактивным фосфором  $^{32}\text{P}$  и добавляли эквимлярное количество комплементарного олигонуклеотида, пробирку прогревали при 95 °С в течение 5 мин. и оставляли остывать на столе. Реакцию гидролиза проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей SE-буфер «G» (10 mM Трис-НCl, pH 7,6; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM NaCl; 1 mM дитиотреитол) и олигонуклеотидный дуплекс в концентрации 74 нМ при температуре 55 °С в течение 1 часа. Электрофорез продуктов гидролиза проводили в денатурирующем 20%-ном растворе ПААГ с 7 М мочевиной в трис-боратном буфере. Радиоавтографию геля проводили с помощью прибора Cyclone Storage System («Packard Instrument Co.» USA). Для каждого меченого продукта определялась величина DLU (Digital Light Units), которая пропорциональна интенсивности излучения изотопом  $^{32}\text{P}$ , за вычетом фона. Процент гидролиза определяли как отношение DLU, для полученного продукта реакции, к сумме DLU, приходящихся на оставшуюся исходную ДНК и полученный фрагмент ДНК. Обработку данных осуществляли с помощью

**Определение места гидролиза ДНК на олигонуклеотидном дуплексе.** Позиция гидролиза ДНК ферментом MteI была установлена путем сравнения длин фрагментов, образующихся при расщеплении олигонуклеотидных дуплексов, содержащих предполагаемый сайт узнавания MteI.

Дуплексы были образованы из следующих синтетических олигонуклеотидов:

программы OptiQuant V. 0.3.00 («Packard Instrument Co.» USA) [2].

## Результаты и обсуждение

### Микробиологическое описание штамма-продуцента MteI

**Культурально-морфологические признаки.** В ходе скрининга почвенных микроорганизмов нами был обнаружен бактериальный штамм-продуцент новой ДНК-эндонуклеазы. На агаризованной среде Луриа – Бертрани (LB) штамм-продуцент образует гладкие блестящие, бледно-оранжевые колонии. Клетки палочковидные размером 0,8×(1,5–2) мкм, неподвижные. Грамположительные.

**Физиолого-биохимические признаки штамма-продуцента.** Облигатный аэроб. Каталазоположительный. Оксидаза не обнаружена. Клетки растут при температуре от +10 до +40 °С, при pH от 6 до 9.

Полученная нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S РНК, на основании которой определили таксономическую специфичность изучаемого штамма:

```

1 actggcggcg tgcttacaca tgcaagtcga acggtgaagc agagcttgct ctgtggatca
61 gtggcgaacg ggtgagtaac acgtgagcaa cctgccctgg actctgggat aagcgtgga
121 aacggcgtct aatactggat atgagacgtg atcgcatggt caacgtttgg aaagattttt
181 cggtctggga tgggctcgcg gcctatcagc ttgttggtga ggtaatggct caccaaggcg
241 tcgacgggta gccggcctga gagggtgacc ggccacactg ggactgagac acggcccgga
301 ctctacggg aggagcagtg ggggaatatt gcacaatggg cgaagcctg atgcagcaac
361 gccgctgag ggatgacggc cttcgggttg taaacctct ttagcaggga agaagcgaaa
421 gtgacggtac ctgcagaaaa agcggcggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt
481 agggcgcaag cgttatccgg aattattggg cgtaaagagc tcgtaggcgg ttgtcgcgt
541 ctgctgtgaa atcccagagc tcaacctcgg gcctgcagtg ggtacgggca gactagagtg
601 cggtagggga gattggaatt cctggtgtag cggtggaatg cgagataatc aggaggaaca
661 ccgatggcga aggcagatct ctgggccgta actgacgctg aggagcgaaa ggggtggggag
    
```

721 caaacaggct tagatacct ggtagtccac cccgtaaacg ttgggaacta gttgtgggga  
 781 ccattccacg gtttccgtga cgcagctaac gcattaagtt ccccgctgg ggagtacggc  
 841 cgcaaggcta aactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcggcgga gcatgcggat  
 901 taattcgatg caacgcgaag aacctacca aggcttgaca tacaccagaa cgggccaaga  
 961 atggtaact cttggacac tgggaacag tgggtgatg gttgtcgtca gctcgtgtcg  
 1021 tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaacctcg ttctatgttg ccagcacgta  
 1081 atgggtggaa ctcattggat actgccgggg tcaactcgga ggaaggtggg gatgacgtca  
 1141 aatcatcatg cccctatgt ctgggcttc acgatgcta caatggccgg tacaaggggc

По определителю [1], а также с помощью анализа первичной структуры фрагмента 16S РНК по программе BLAST [9] штамм-продуцент был определен как *Microbacterium testaceum* 17В. Продуцируемая этим штаммом сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза названа MteI согласно номенклатуре [11].

Получение препарата фермента. Выход биомассы составил 5 г/л. Из 130 г биомассы было получено 3,5 мл препарата фермента.

#### Гидролиз ДНК эндонуклеазой MteI

**Предварительный анализ субстратной специфичности MteI на неметилированных и различных С5-метилированных субстратах.** В качестве субстратов для определения субстратной специфичности на первом этапе мы использовали ДНК фагов  $\lambda$  и T7, ДНК плазмид  $\rho$ Fsp4HI3 [6],  $\rho$ HspAI2 [3] и  $\rho$ HspAI10 (см. «Материалы и методы»). На рисунке 1 приведены результаты обработки описанных выше субстратов эндонуклеазой MteI.

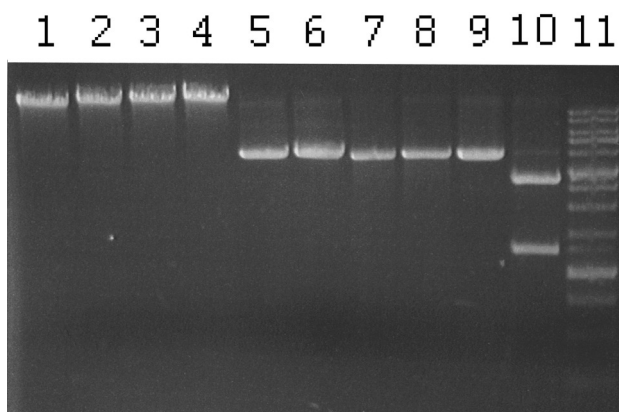


Рис. 1. Гидролиз препаратов ДНК ферментом MteI. Время реакции – 1 ч. MteI добавляли по 1 мкл на 20 мкл реакционной смеси. Дорожки: 1 – ДНК фага  $\lambda$ ; 2 – ДНК фага  $\lambda$ +MteI; 3 – ДНК фага T7; 4 – ДНК фага T7+MteI; 5 –  $\rho$ Fsp4HI3/DriI; 6 –  $\rho$ Fsp4HI3/DriI+MteI; 7 –  $\rho$ HspAI2/DriI; 8 –  $\rho$ HspAI2/DriI+MteI; 9 –  $\rho$ HspAI10/DriI; 10 –  $\rho$ HspAI10/DriI+MteI; 11 – маркер молекулярной массы ДНК 1 kb.

Как видно из рисунка 1, MteI не расщепляет ДНК фагов  $\lambda$  (дорожка 2) и T7 (дорожка 4); ДНК плазмиды  $\rho$ Fsp4HI3, которая метилирована по последовательности 5'-GCNGC-3' и содержит метилированный сайт 5'-G(5mC)GG(5mC)-3'/3'-(5mC)GC(5mC)G-5' (дорожка 6), а также не расщепляет ДНК плазмиды  $\rho$ HspAI2, содержащей сайт 5'-G(5mC)G(5mC)G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G(5mC)G(5mC)G-5' (дорожка 8). При этом MteI расщепляет линейаризованную плазмиду  $\rho$ HspAI10 (дорожка 10), которая содержит последовательность 5'-G(5mC)G(5mC)GCAG(5mC)G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G(5mC)GTCCG(5mC)G(5mC)G-5'.

**Гидролиз субстратных ДНК, содержащих ген метилазы M.HspAI.** Помимо плазмиды  $\rho$ HspAI10, являющейся субстратом MteI (рис. 1, дорожка 10), мы проверили возможность гидролиза эндонуклеазой MteI плазмид  $\rho$ HspAI4 и  $\rho$ HspAI12, также содержащих ген метилазы HspAI (см. раздел «Материалы и методы»), но имеющих несколько другую структуру и узор метилирования сайта узнавания.

Как отмечалось в «Материалах и методах», все эти субстраты содержат последовательность 5'-GCC CAGCGC-3' с разным окружением и отличающимся узором метилирования. В частности, в  $\rho$ HspAI4 эта последовательность представляет собой сайт 5'-G(5mC)GCAG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GTCCG(5mC)G-5', в  $\rho$ HspAI12 – 5'-G(5mC)G(5mC)GCAG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G(5mC)GTCCG(5mC)G-5', а в  $\rho$ HspAI10 – 5'-G(5mC)G(5mC)GCAG(5mC)G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G(5mC)GTCCG(5mC)G(5mC)G-5'.

Кроме того, для анализа субстратной специфичности MteI мы использовали эти же три плазмиды, дополнительно модифицированные метилазой Fsp4HI [8]. При их обработке метилазой Fsp4HI происходит метилирование цитозинов, прилегающих к центральному нуклеотиду А или Т в обеих цепях в последовательности 5'-GCGCAGCGC-3'/3'-CGCGTCCGCG-5'.

На рисунке 2 приведены результаты гидролиза ферментом MteI линейной формы плазмид  $\rho$ HspAI4,

ρHspAI10 и ρHspAI12, а также продуктов их модификации метилазой M.Fsp4HI. В качестве фермента сравнения нами использовалась МСС ДНК-эндонуклеаза PkrI, которая узнает и расщепляет последовательность 5'-GCNGC-3' при наличии в обеих цепях сайта узнавания как минимум трех 5-метилцитозинов [4].

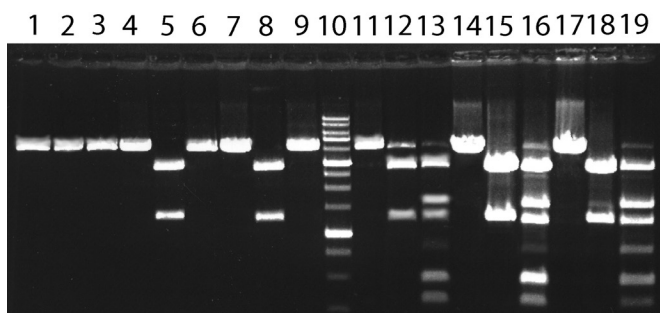


Рис. 2. Гидролиз плазмидных ДНК ферментами MteI и PkrI. Время реакции – 8 ч. Добавлено по 1 мкл препарата фермента на 20 мкл реакционной смеси. Дорожки: 1 – ρHspAI4/DriI; 2 – ρHspAI4/DriI+MteI; 3 – ρHspAI4/DriI+PkrI; 4 – ρHspAI10/DriI; 5 – ρHspAI10/DriI+MteI; 6 – ρHspAI10/DriI+PkrI; 7 – ρHspAI12/DriI; 8 – ρHspAI12/DriI+MteI; 9 – ρHspAI12/DriI+PkrI; 10 – маркер молекулярной массы ДНК 1 kb; 11 – ρHspAI4/DriI+M.Fsp4HI; 12 – ρHspAI4/DriI+M.Fsp4HI+MteI; 13 – ρHspAI4/DriI+M.Fsp4HI+PkrI; 14 – ρHspAI10/DriI+M.Fsp4HI; 15 – ρHspAI10/DriI+M.Fsp4HI+MteI; 16 – ρHspAI10/DriI+M.Fsp4HI+PkrI; 17 – ρHspAI12/DriI+M.Fsp4HI; 18 – ρHspAI12/DriI+M.Fsp4HI+MteI; 19 – ρHspAI12/DriI+M.Fsp4HI+PkrI

Как видно из рисунка 2, MteI не гидролизует ρHspAI4 (дорожка 2), но расщепляет ρHspAI10 и ρHspAI12 (дорожки 5 и 8, соответственно), а также продукты метилирования этих плазмид ферментом M.Fsp4HI (дорожки 12, 15 и 18, соответственно). При этом только на 12-й дорожке не наблюдается полного гидролиза исходной ДНК, что позволяет рассматривать последовательность 5'-G(5mC)G(5mC)AG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GT(5mC)G(5mC)G-5' как минимальный сайт узнавания, тогда как сайт 5'-G(5mC)GCAG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GT(5mC)G-5' (дорожка 2) не является субстратом фермента MteI.

Интересно отметить, что МСС ДНК-эндонуклеаза PkrI не расщепляет модифицированную последовательность 5'-GCGCAGCGC-3' в изучаемых субстратах только в двух случаях (дорожки 3 и 9), когда центральный пентануклеотид последовательности содержит только 2 метилированных цитозина, что соответ-

ствует ранее установленной субстратной специфичности PkrI [4]. При этом PkrI расщепляет плазмиды ρHspAI12 и ρHspAI10, модифицированные метилазой M.Fsp4HI, не только по центральному пентануклеотиду с четырьмя 5-метилцитозинами, но также и по четырем другим метилированным сайтам 5'-GCNGC-3', содержащим три 5-метилцитозина.

Таким образом, МСС ДНК-эндонуклеаза MteI узнает протяженную C5-метилированную последовательность 5'-G(5mC)G(5mC)AG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GT(5mC)G(5mC)G-5' и существенно отличается по субстратной специфичности от ранее описанных МСС ДНК-эндонуклеаз BisI, BlnI, GluI и PkrI, которые узнают модифицированную последовательность 5'-GCNGC-3'/3'-CGNCG-5' при наличии в ней от двух до четырех 5-метилцитозинов.

На рисунке 3 представлены результаты более детального определения активности MteI при гидролизе линейной формы плазмид ρHspAI10 и ρHspAI12, а также плазмид ρHspAI4, ρHspAI10 и ρHspAI12, модифицированных метилазой Fsp4HI.

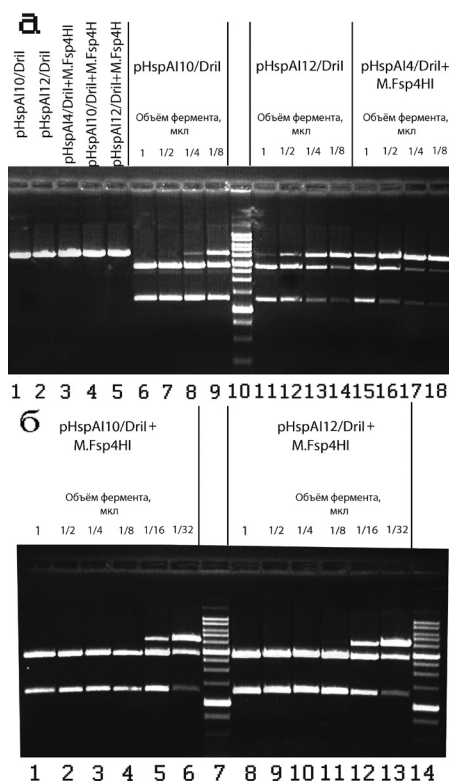


Рис. 3. Сравнение активности MteI при расщеплении различных плазмид. Определение активности фермента проводилось стандартным образом путем гидролиза препаратов ДНК несколькими разведениями фермента: реакционную смесь с 1 мкл препарата MteI последовательно разбавляли в два, четыре и восемь раз реакционной смесью без фермента. Время реакции – 1 ч.

*Дорожки:* **а)** 1 – ρHspAI10/DriI; 2 – ρHspAI12/DriI; 3 – ρHspAI4/DriI+M.Fsp4HI; 4 – ρHspAI10/DriI+M.Fsp4HI; 5 – ρHspAI12/DriI+M.Fsp4HI; 6 – ρHspAI10/DriI + 1 мкл MteI; 7 – ρHspAI10/DriI + 1/2 мкл MteI; 8 – ρHspAI10/DriI + 1/4 мкл MteI; 9 – ρHspAI10/DriI + 1/8 мкл MteI; 10 – маркер молекулярной массы ДНК; 11 – ρHspAI12/DriI + 1 мкл MteI; 12 – ρHspAI12/DriI + 1/2 мкл MteI; 13 – ρHspAI12/DriI + 1/4 мкл MteI; 14 – ρHspAI12/DriI + 1/8 мкл MteI; 15 – ρHspAI4/DriI + M.Fsp4HI + 1 мкл MteI; 16 – ρHspAI4/DriI + M.Fsp4HI + 1/2 мкл MteI; 17 – ρHspAI4/DriI + M.Fsp4HI + 1/4 мкл MteI; 18 – ρHspAI4/DriI + M.Fsp4HI + 1/8 мкл MteI; **б)** 1 – ρHspAI10/DriI + M.Fsp4HI + 1 мкл MteI; 2 – ρHspAI10/DriI + M.Fsp4HI + 1/2 мкл MteI; 3 – ρHspAI10/DriI + M.Fsp4HI + 1/4 мкл MteI; 4 – ρHspAI10/DriI + M.Fsp4HI + 1/8 мкл MteI; 5 – ρHspAI10/DriI + M.Fsp4HI + 1/16 мкл MteI; 6 – ρHspAI10/DriI + M.Fsp4HI + 1/32 мкл MteI; 7 – маркер молекулярной массы ДНК; 8 – ρHspAI12/DriI + M.Fsp4HI + 1 мкл MteI; 9 – ρHspAI12/DriI + M.Fsp4HI + 1/2 мкл MteI; 10 – ρHspAI12/DriI + M.Fsp4HI + 1/4 мкл MteI; 11 – ρHspAI12/DriI + M.Fsp4HI + 1/8 мкл MteI; 12 – ρHspAI12/DriI + M.Fsp4HI + 1/16 мкл MteI; 13 – ρHspAI12/DriI + M.Fsp4HI + 1/32 мкл MteI; 14 – маркер молекулярной массы ДНК

Как видно из рисунка 3, наименьшую активность MteI обнаруживает при гидролизе ρHspAI4, модифицированной метилазой M.Fsp4HI (рис. 3а, дорожки 15–18). Этот результат соответствует сделанному выше заключению, что последовательность 5'-G(5mC)G(5mC)AG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GT(5mC)G(5mC)G-5' представляет собой минимальный сайт и хуже остальных субстратов расщепляется ферментом MteI. Немного лучшим субстратом является последовательность 5'-G(5mC)G(5mC)GCAG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G(5mC)GT(5mC)G(5mC)G-5' в плазмиде ρHspAI12 (рис. 3а, дорожки 11–14). Фермент MteI не расщепляет полностью линейную форму обеих этих плазмидных ДНК (рис 3а, дорожки 11 и 15) и, таким образом, при их гидролизе проявляет активность меньше одной единицы в микролитре. Существенно большую активность (2 единицы в микролитре в пересчете на рассматриваемый субстрат) мы наблюдаем при расщеплении последовательности 5'-G(5mC)G(5mC)GCAG(5mC)G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G(5mC)GT(5mC)G(5mC)G-5' в плазмиде ρHspAI10 (рис. 3а, дорожки 6–9). И, наконец, MteI проявляет активность 8 единиц в микролитре при расщеплении субстратов с последо-

вательностями G(5mC)G(5mC)G(5mC)AG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G(5mC)GT(5mC)G(5mC)G-5' и 5'-G(5mC)G(5mC)G(5mC)AG(5mC)G(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)G(5mC)GT(5mC)G(5mC)G(5mC)G-5' в плаزمиде ρHspAI12 и ρHspAI10, соответственно, модифицированных метилазой M.Fsp4HI. Полученные результаты суммированы в таблице 1.

На основе полученных данных в качестве канонического субстрата для MteI нами была выбрана ДНК плазмиды ρHspAI10, линейризованная рестриктазой DriI и модифицированная метилазой M.Fsp4HI. Поэтому за одну единицу активности MteI мы принимаем такое минимальное количество фермента, которое необходимо для полного гидролиза единственного сайта узнавания в 1 мкг ДНК плазмиды ρHspAI10/DriI+M.Fsp4HI в 20 мкл реакционной смеси, содержащей SE-буфер «Y», при 48 °C за 60 минут. Активность исследуемого препарата MteI при гидролизе канонического субстрата составляет 8 единиц в микролитре.

**Гидролиз субстратных ДНК, содержащих ген метилазы M.Fsp4HI.** В качестве возможного субстрата MteI мы проверяли также ряд плазмид, содержащих ген метилазы Fsp4HI (см. Материалы и методы). На рисунке 4 приведены результаты гидролиза линейной формы этих плазмид и ρHspAI10 ферментом MteI. Как видно из рисунка 4, MteI не расщепляет ДНК плазмид ρFsp4HI4 (дорожка 4), ρFsp4HI6 (дорожка 6) и ρFsp4HI8 (дорожка 8).

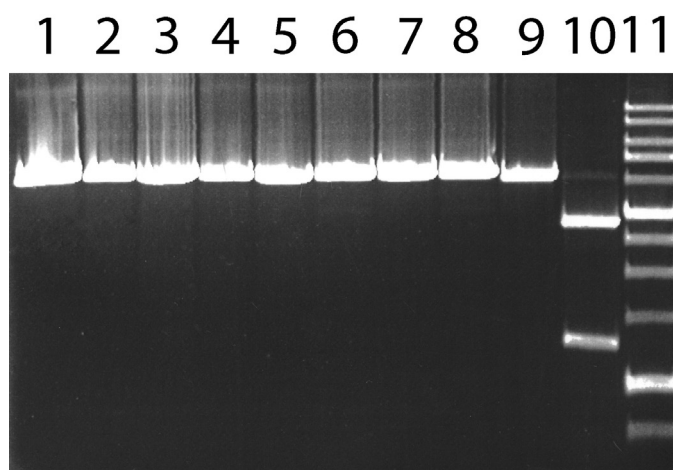


Рис. 4. Гидролиз MteI субстратных ДНК, содержащих ген метилазы M.Fsp4HI. *Дорожки:* 1 – ρFsp4HI3/DriI; 2 – ρFsp4HI3/DriI+MteI; 3 – ρFsp4HI4/DriI; 4 – ρFsp4HI4/DriI+MteI; 5 – ρFsp4HI6/DriI; 6 – ρFsp4HI6/DriI+MteI; 7 – ρFsp4HI8/DriI; 8 – ρFsp4HI8/DriI+MteI; 9 – ρHspAI10/DriI; 10 – ρHspAI10/DriI+MteI; 11 – маркер молекулярной массы ДНК

Итак, последовательность 5'-G(5mC)CG(5mC)AG(5mC)CGC-3'/3'-CGG(5mC)GT(5mC)GG(5mC)G-5', имеющаяся в составе ρFsp4HI6, не является субстратом MteI (дорожка 6), хотя его центральная подчеркнутая часть совпадает с центральной частью гидролизуемого сайта в плазмиде ρHspAI4, метилированной метилазой Fsp4HI.

Из полученных результатов и анализа данных в таблице 1 следует, что фермент MteI способен расщеплять последовательность 5'-G(5mC)AG(5mC)-3'/3'-(5mC)GT(5mC)G-5' при наличии дополнительного G(5mC)-динуклеотида на 5'-конце верхней и нижней цепи, что

и приводит к формуле минимального сайта 5'-G(5mC)G(5mC)AG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GT(5mC)G(5mC)G-5, являющегося наиболее плохим субстратом фермента. В то же время MteI обнаруживает существенно большую активность при замене в сайте узнавания 5'-GC-3' динуклеотидов на 5'-G(5mC)-3' динуклеотиды и появлении дополнительных 5'-G(5mC)-3' динуклеотидов на 5'-концах нонануклеотида в обеих цепях ДНК. Надо отметить, что метилирование метилазой Fsp4HI цитозинов, прилегающих к центральному нуклеотиду узнаваемой последовательности (А или Т), также приводит к значительному увеличению активности MteI.

Таблица 1

### Активность MteI в реакции гидролиза субстратных ДНК, содержащих ген метилазы M.HspAI

Метилированная последовательность	Плаزمида с сайтом узнавания MteI	Количество 5-метилцитозинов в метилированной последовательности	Активность MteI при гидролизе плазмидной ДНК
5'-G(5mC)G CAG(5mC)G C-3' 3'-C G(5mC)GTC G(5mC)G-5'	ρHspAI4	4	—
5'-G(5mC)G(5mC)G CAG(5mC)G C-3' 3'-C G(5mC)G(5mC)GTC G(5mC)G-5'	ρHspAI12	6	< 1 ед./мкл
5'-G(5mC)G(5mC)A G(5mC)G C-3' 3'-C G(5mC) G T(5mC)G(5mC)G-5'	ρHspAI4/M.Fsp4HI	6	< 1 ед./мкл
5'-G(5mC)G(5mC)G CAG(5mC)G(5mC)G C-3' 3'-C G(5mC)G(5mC)GTC G(5mC)G(5mC)G-5'	ρHspAI10	8	2 ед./мкл
5'-G(5mC)G(5mC)G(5mC)A G(5mC)G C-3' 3'-C G(5mC)G(5mC)G T(5mC)G(5mC)G-5'	ρHspAI12/M.Fsp4HI	8	8 ед./мкл
5'-G(5mC)G(5mC)G(5mC)A G(5mC)G(5mC)G C-3' 3'-C G(5mC)G(5mC)G T(5mC)G(5mC)G(5mC)G-5'	ρHspAI10/M.Fsp4HI	10	8 ед./мкл

**Гидролиз ферментом MteI ДНК фага λ, метилированной метилазами HspAI и Fsp4HI.** Дальнейшее определение субстратной специфичности MteI проводилось нами при использовании в качестве субстрата ДНК фага λ, последовательно метилированной метилазами HspAI и Fsp4HI. Результаты этого анализа представлены на рисунке 5.

Полнота метилирования ДНК фага λ метилазами HspAI и Fsp4HI проверялась по блокированию гидролиза рестриктазами HspAI (дорожка 2) и Fsp4HI (дорожка 3), соответственно. Из рисунка 5 видно, что при добавлении в реакционную смесь 4, 2, 1 и 0,5 единиц активности MteI (дорожки 4, 5, 6, 7, соответственно) на электрофореграмме наблюдается появление трех полос продуктов гидролиза. Анализ структуры ДНК показы-

вает, что в нуклеотидной последовательности ДНК фага λ в положении 2498-2506 находится последовательность 5'-GCCGTGCCG-3', а в позиции 5437-5445 лежит сайт 5'-GCCGCGCGC-3'. При обработке ДНК фага λ метилазами HspAI и Fsp4HI в первом случае образуется последовательность 5'-G(5mC)G(5mC)AG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GT(5mC)G(5mC)G-5', тогда как во втором случае образуется последовательность 5'-G(5mC)G(5mC)GG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GC(5mC)G(5mC)G-5'. Данные последовательности соответствуют минимальному сайту MteI, определенному выше. Как видно из рисунка 5, электрофоретическая подвижность образующихся фрагментов ДНК (≈2500 и ≈2940 п.н.) соответствует продуктам гидролиза субстратной ДНК по позициям 2498 и 5437. Наблюдаемая



менее яркая третья полоса длиной  $\approx 5500$  п.н. образуется, вероятно, из первых двух вследствие неполного гидролиза сайта в позиции 2498.

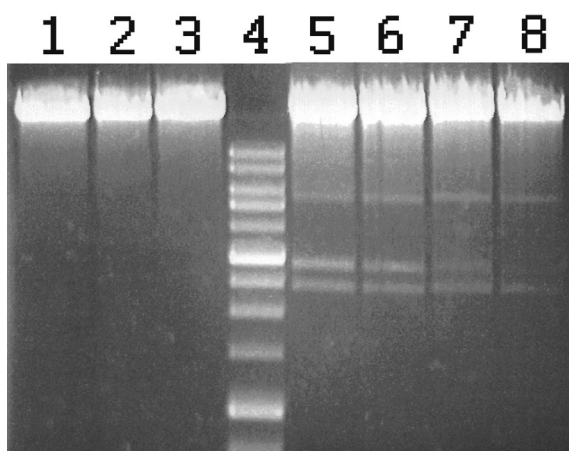


Рис. 5. Гидролиз ДНК фага  $\lambda$ , метилированной метилазами HspAI и Fsp4NI. Время реакции – 30 мин. Объем реакционной смеси – 20 мкл. Дорожки: 1 – ДНК фага  $\lambda$ /M.HspAI+M.Fsp4NI; 2 – ДНК фага  $\lambda$ /M.HspAI+M.Fsp4NI+HspAI; 3 – ДНК фага  $\lambda$ /M.HspAI+M.Fsp4NI+Fsp4NI; 4 – маркер молекулярной массы ДНК; 5 – ДНК фага  $\lambda$ /M.HspAI+M.Fsp4NI + 4 ед. активности MteI; 6 – ДНК фага  $\lambda$ /M.HspAI+M.Fsp4NI + 2 ед. активности MteI; 7 – ДНК фага  $\lambda$ /M.HspAI+M.Fsp4NI + 1 ед. активности MteI; 8 – ДНК фага  $\lambda$ /M.HspAI+M.Fsp4NI + 0,5 ед. активности MteI

Таким образом, из полученных данных по гидролизу метилированной ДНК фага  $\lambda$  и различных плазмидных ДНК можно сделать вывод о том, что MteI расщепляет минимальный сайт 5'-G(5mC)G(5mC)NG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GN(5mC)G(5mC)G-5'.

### Определение позиции гидролиза ДНК эндонуклеазой MteI

Для подтверждения установленной последовательности узнавания и определения позиций расщепления ДНК в сайте узнавания мы проводили гидролиз ферментом MteI олигонуклеотидных дуплексов.

Определение места гидролиза ДНК-эндонуклеазой MteI осуществляли путем сравнения длин фрагментов, образуемых при расщеплении эндонуклеазами MteI и GluI олигонуклеотидных дуплексов Mte3/Mte4 (содержит А/Т пару в центре сайта MteI) и Glu7/Glu8 (содержит G/С пару в центре). В качестве маркера длин фрагментов использовали продукты частичного расщепления этих же дуплексов экзонуклеазой ExoIII.

На рисунке 6а изображен радиоавтограф электрофореграммы продуктов расщепления дезоксирибоолиго-

нуклеотидного радиоактивно меченного дуплекса Mte3/Mte4 в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины. На рисунке 6б приведен радиоавтограф электрофореграммы продуктов расщепления радиоактивно меченного дуплекса Glu7/Glu8 в тех же условиях.

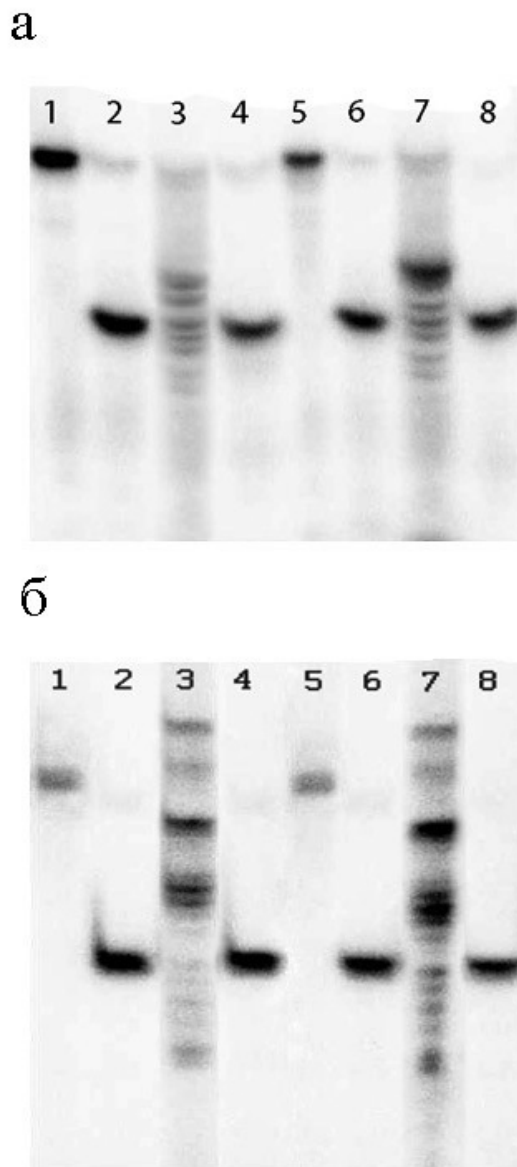


Рис. 6. Определение позиции гидролиза ДНК ферментом MteI на дуплексах Mte3/Mte4 (а) и Glu7/Glu8 (б). Электрофорез в 20% ПААГ с 7 М мочевиной. Олигонуклеотиды, меченные  $^{32}P$  по 5'-концу, обозначены знаком \*. Дорожки: а) 1 – Mte3\*/Mte4; 2 – Mte3\*/Mte4 + MteI; 3 – Mte3\*/Mte4 + ExoIII; 4 – Mte3\*/Mte4 + GluI; 5 – Mte4\*/Mte3; 6 – Mte4\*/Mte3 + MteI; 7 – Mte4\*/Mte3 + ExoIII; 8 – Mte4\*/Mte3 + GluI; б) 1 – Glu7\*/Glu8; 2 – Glu7\*/Glu8 + MteI; 3 – Glu7\*/Glu8 + ExoIII; 4 – Glu7\*/Glu8 + GluI; 5 – Glu8\*/Glu7; 6 – Glu8\*/Glu7 + MteI; 7 – Glu8\*/Glu7 + ExoIII; 8 – Glu8\*/Glu7 + GluI

Из рисунка 6а видно, что продукты гидролиза ДНК дуплекса Mte3\*/Mte4 на дорожках 2 и 4, а также дуплекса Mte4\*/Mte3 на дорожках 6 и 8 имеют одинаковые длины. То же можно сказать про полосы на рисунке 6б (дорожки 2 и 5 для дуплекса Glu7\*/Glu8 и дор. 7 и 10 для дуплекса Glu8\*/Glu7). Из данных, приведенных на рисунке 6, следует, что MteI расщепляет ДНК перед центральным нуклеотидом N в последовательности: 5'-G(5mC)G(5mC)^NG(5mC)G(5mC)-3' и позиции гидролиза ДНК ферментами GluI и MteI совпадают.

### Заключение

Представленная в данной работе новая метилзависимая сайт-специфическая ДНК-эндонуклеаза MteI имеет минимальный сайт узнавания 5'-G(5mC)G(5mC)^NG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GN^(5mC)G(5mC)G-5' и расщепляет ДНК как указано стрелками. Замена в сайте узнавания 5'-GC-3' динуклеотидов на 5'-G(5mC)-3' динуклеотиды и появление дополнительных 5'-G(5mC)-3' динуклеотидов на 5'-концах нонануклеотида в обеих цепях ДНК приводят к значительному возрастанию активности фермента.

Ранее для ряда МСС ДНК-эндонуклеаз нами было показано существенное увеличение их активности при замене цитозина на 5-метилцитозин в сайте узнавания, который является совершенно определенным по размерам [2, 5]. Однако в случае MteI мы наблюдаем значительное увеличение активности фермента при расширении сайта узнавания и появлении в обеих цепях дополнительных 5-метилцитозина. Такой феномен значительного возрастания активности фермента с увеличением размеров его сайта узнавания представляется новым для МСС ДНК-эндонуклеаз, и мы планируем его детальное исследование в последующих работах.

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

### Литература

1. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта и др. 9-е изд. в 2 томах: Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина. — М., 1997. — Т.1 (432 с.). — Т.2 (678 с.).

2. Томилова Ю.Э., Чернухин В.А., Дегтярев С.Х. Зависимость активности сайт-специфической эндонуклеазы GluI от количества и положения метилированных цитозина в узнаваемой последовательности 5'-GCCG-3' // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2006. — Т. 2. — № 1. — С. 30–39.

3. Чернухин В.А., Наякина Т.Н., Абдурашитов М.А., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Михненко Н.А., Гончар Д.А., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции GluI узнает метилированную последовательность 5'-GCCG-3' // Биотехнология. — 2006. — № 4. — С. 31–35.

4. Чернухин В.А., Наякина Т.Н., Гончар Д.А., Томилова Ю.Э., Тарасова М.В., Михненко Н.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Новая сайт-специфическая метилзависимая ДНК-эндонуклеаза PklI узнает и расщепляет метилированную последовательность ДНК 5'-GCN^GC-3'/3'-CG^NCG-5', содержащую не менее трех 5-метилцитозина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2011. — Т. 7. — № 3. — С. 35–41.

5. Чернухин В.А., Томилова Ю.Э., Чмуж Е.В., Соколова О.О., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Сайтспецифическая эндонуклеаза BslI узнает последовательности ДНК 5'-G(5mC)NGC-3' и расщепляет ее с образованием 3'-выступающих концов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 1. — С. 28–33.

6. Чернухин В.А., Чмуж Е.В., Томилова Ю.Э., Наякина Т.Н., Гончар Д.А., Дедков В.С., Дегтярев С.Х. Новая сайт-специфическая эндонуклеаза GluI узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)NG(5mC)-3'/3'-(5mC)GN(5mC)G-5' // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — № 2. — С. 13–17.

7. Чмуж Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э., Мезенцева Н.В., Дедков В.С., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Новая эндонуклеаза рестрикции BslI из *Vacillus subtilis* T30 узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G(5mC)^NGC-3' // Биотехнология. — 2005. — № 3. — С. 22–26.

8. Чмуж Е.В., Каширина Ю.Г., Томилова Ю.Э., Чернухин В.А., Охупкина С.С., Гончар Д.А., Дедков В.С., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Клонирование генов, сравнительный анализ структуры белков системы рестрикции-модификации Fsp4NI и биохимическая характеристика рекомбинантной ДНК-метилтрансферазы M.Fsp4NI // Молекулярная биология. — 2007. — Т. 41. — № 1. — С. 43–50.

9. Madden T.L., Tatusov R.L., Zhang J. Applications of network BLAST server // Meth. Enzymol. — 1996. — Vol. 266. — P. 131–141.

10. Roberts R.J., Vineze T., Posfai J., Macelis D. REBASE — restriction enzymes and methylases // Nucl. Acids Res. — 2003. — Vol. 31. — P. 418–420.
11. Smith H.O., Nathans D. A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes // J. Mol. Biol. — 1973. — Vol. 81. — P. 419–423.

Список сокращений:

ЕхоIII — экзонуклеаза III из *E. coli*,  
 ПААГ — полиакриламидный гель,  
 ед. — единица активности,  
 п.н. — пары нуклеотидов ДНК,  
 5mC — 5-метилцитозин,  
 ДНК-метилтрансфераза — метилаза

## A NEW METHYL-DIRECTED SITE-SPECIFIC DNA ENDONUCLEASE MteI CLEAVES NINE NUCLEOTIDES SEQUENCE

5'-G(5MC)G(5MC)<sup>^</sup>NG(5MC)GC-3'/3'-CG(5MC)GN<sup>^</sup>(5MC)G(5MC)G-5'

V.A. CHERNUKHIN, E.V. KILEVA, V.A. SOKOLOVA, D.A. GONCHAR, L.N. GOLIKOVA,  
 V.S. DEDKOV, N.A. MIKHENKOVA, S.KH. DEGTYAREV

*SibEnzyme Ltd., Novosibirsk*

We have discovered and purified a new methyl-directed site-specific DNA endonuclease MteI from bacterial strain *Microbacterium testaceum* 17B. The enzyme recognizes methylated DNA sequence and doesn't cleave unmethylated DNA. MteI is a first methyl-directed site-specific DNA endonuclease recognizing a prolonged DNA sequence and the enzyme activity depends on a number of 5-methylcytosines in a recognition site and a pattern of methylation. MteI cleaves DNA sequence 5'-G(5mC)G(5mC)<sup>^</sup>NG(5mC)GC-3'/3'-CG(5mC)GN<sup>^</sup>(5mC)G(5mC)G-5' as indicated by arrows and this nonanucleotide is a minimal recognition site. The enzyme activity is significantly higher if 5'-GC-3' dinucleotides in this site are replaced by 5'-G(5mC)-3' dinucleotides and additional 5'-G(5mC)-3' dinucleotides are present at 5'-ends in both DNA strands. Due to an ability to cleave only prolonged methylated DNA sequences MteI may find a practical application in the molecular biology and epigenetics studies.

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

## ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА «СТАФИЛОЛЕЙКИН» ИЗ ОСАДКА «Б» – ОТХОДА ПРОИЗВОДСТВА АНТИСТАФИЛОКОККОВОГО ДОНОРСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА

Т.М. АФАНАСЬЕВА<sup>1</sup>, В.П. ПЕТРОВСКИХ<sup>1</sup>, А.М. НИКОЛАЕВА<sup>1\*</sup>,  
А.В. КАЗЬЯНИН<sup>1</sup>, А.Н. МАЦ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Филиал ФГУП «НПО «Микроген» МЗиСР РФ в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед», Пермь;

<sup>2</sup> НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва

Разработана технология получения терапевтического препарата антистафилококковой направленности, названного «Стафилолейкин». Новизна технологии состоит в использовании отходов производства антистафилококкового иммуноглобулина в качестве исходного сырья, а также в оригинальном процессе выделения и дезагрегации растворимых Т-клеточных антигенсвязывающих белков. Исследованы основные характеристики разработанного препарата. Показана иммунотерапевтическая активность «Стафилолейкина» в эксперименте.

**Ключевые слова:** низкомолекулярные антигенспецифичные цитокины, Т-клеточные антигенсвязывающие белки, экспериментальный стафилококковый гнойный кератит, перенос гиперчувствительности замедленного типа к стафилококковому белку А.

### Введение

Плазма крови человека состоит из ряда компонентов, среди которых альбумин, различные классы иммуноглобулинов, факторы свертывания, антикоагулянты, ингибиторы протеаз, факторы роста клеток и т.д. [8]. Некоторые из этих компонентов еще не полностью охарактеризованы. 27 белков плазмы, относящиеся к высокомолекулярному (ММ более 15 кДа) субпротеому, способны аффинно связываться с антигенами и тем самым обеспечивать антигенспецифичность коммерческих препаратов иммуноглобулинов, которые уже более полувека успешно применяются для создания пассивного гуморального иммунитета. Однако для иммунотерапии хронической инфекционной патологии, обусловленной внутриклеточными возбудителями, требуются новые препараты, способные создавать пассивный специфический клеточный иммунитет.

Разработка таких препаратов оказалась более сложной задачей, прежде всего, из-за неопределенности в вопросе о том, что является специфическим гуморальным фактором клеточного иммунитета. Исследование кандидатов на эту роль началось в 1960-х годах. Кроме иммуноглобулинов, в плазме крови в малых концентрациях присутствуют и другие гуморальные факторы, способные с различной аффинностью, иногда достигающей параметров антител, связываться со специфическими антигенами. Это – растворимые формы  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепей Т-клеточного рецептора, солубилизированные нормальные и аномальные продукты МНС класса I и II, антигенспецифичные факторы Т-супрессоров и антигенспецифичные цитокины (существование которых пока только предполагается).

Экспериментально удалось осуществить пассивный перенос клеточного иммунитета и ряд иммунорегуляторных воздействий с помощью альфа-глобулинов гипериммунной сыворотки, растворимых Т-клеточных рецепторов (в частности, гамма-дельта Т-клеток) и препаратов растворимых Т-клеточных антигенсвязывающих белков (ТАБ) [5, 7].

В таблице 1 перечислены основные функциональные характеристики ТАБ, выделенных из осадка Б (фракция III по E. Sohn). Однако эти антигенсвязывающие белки плазмы человека, кроме гамма-цепей CD3 Т-клеточного рецептора, полностью не охарактеризо-

© 2012 г. Афанасьева Т.М., Петровских В.П., Николаева А.М., Казьянин А.В., Мац А.Н.

\* **Автор для переписки:**

Николаева Алла Максимовна

д.б.н., заместитель директора по научной работе и инновационному развитию Филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗиСР РФ в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»

Тел.: +7 (3422) 62-32-75

E-mail: a.m.nikolaeva@perm.microgen.ru

ваны и пока не стали основой иммунотерапевтических лекарственных средств.

Таблица 1

**Функциональные характеристики ТАБ**

№ п/п	Предполагаемое функциональное участие ТАБ в иммунном ответе
1	ТАБ аффинно связывают непротессированный антиген без участия продуктов МНС
2	Комплекс ТАБ + антиген присоединяет IL-10, TGF $\beta$ , эластазу и простагландины
3	Происходит антигензависимое фокусирование этих цитокинов в тканях
4	Индукция клеточного иммунитета, сдерживание и подавление Т-зависимого воспаления

Тем не менее эмпирически удачным направлением оказалось исследование белков, представленных в низкомолекулярном (ММ меньше 15 кДа) субпротеоме плазмы человека. Более полувека в иммунологии существует загадочный, но легко воспроизводимый феномен — диализат Т-лимфоцитов иммунного индивида при введении неиммунному способен перенести специфический клеточный иммунитет.

Субстанции, осуществляющие такой перенос иммунореактивности, классик клеточной иммунологии D.C. Dumonde [6] назвал низкомолекулярными антигенспецифичными цитокинами (НАСЦ) (табл. 2), которые, согласно предположению известного исследователя Т-клеточной рецепторики J.J. Marchalonis [7], можно отнести к неиммуноглобулиновым «иммунопротеинам» или «иммунопептидам». Иммунотерапевтический потенциал коммерческих препаратов НАСЦ — «LeukoNorm CytoChemia®» (CytoChemia, Biologisch-Pharmazeutische Preparate GmbH, Plauen, Deutschland), «Immodin®» (Sevapharma, Praha), «Transfer-Faktor®» (Red Cross Research Centre on Transfer Faktor, Beijing, China), «Hebertrans®» (Heber, Havana, Cuba) и Аффинолейкин (Россия) — при хронической инфекционной патологии неоднократно был предметом обзоров [1, 3, 4].

Низкомолекулярный субпротеом плазмы человека содержит 20 хорошо охарактеризованных белков с функцией цитокинов/хемокинов — это пептиды из 52–128 аминокислотных остатков ММ 5–14 кДа, стереоспецифичные только к клеточным рецепторам, но не к антигенам. В то же время НАСЦ, еще недостаточно охарактеризованные по структуре и геномике и поэтому еще не включенные в базы данных протеома плазмы человека, обладают рядом особых свойств, перечисленных в таблице 3.

Таблица 2

**Молекулярные свойства аффинноочищенных низкомолекулярных антигенспецифичных цитокинов**

№ п/п	Показатель	Свойства
1	Общая характеристика	Гидрофильные негативно заряженные $\alpha$ -глобулины. Относительно термостабильны
2	Молекулярная масса	5 – 8 кДа
3	Структура	40–60 аминокислотных остатков, переменная (V) и константная (C) части; В C-фрагменте секвенирован общий для всех НАСЦ декапептид L L Y A Q D L / V E D N
4	Аффинность к гомологичному антигену	Прямое связывание с нативным антигеном
5	Взаимодействие с антителами и антигеном	Шапероноподобный эффект при связывании: Антиген + НАСЦ + Антитела
6	Взаимодействие с клетками	Адсорбция на Т-хелперах 1, гранулоцитах, моноцитах и макрофагах
7	Иммуноспецифическая активность	Активны в пиколярной концентрации

Присутствие НАСЦ в препарате ТАБ, по всей вероятности, обусловлено тем, что они представляют собой отделившиеся при криодезинтеграции антигенсвязывающие фрагменты ТАБ или прочно с ними связанные молекулы [2, 4]. В любом случае низкомолекулярные субпротеомы нормальной плазмы человека в момент кровопускания и донорской плазмы (как исходного сырья для производства иммуноглобулиновых препаратов) должны существенно различаться. Во взятой в антикоагулянт донорской крови еще до отделения плазмы в нее переходит множество эритроцитарных, лейкоцитарных и тромбоцитарных белков (из-за распада клеток и солюбилизации компонентов мембран) и происходит образование агрегатов. Кроме того, во время карантинизации плазмы происходят протеолиз, окисление, агрегация и дезагрегация белков.

Нашей задачей была разработка технологии получения терапевтического препарата НАСЦ антистафилококковой направленности, названного «Стафилолейкин». Новизна технологии состоит в использовании для производства не применявшегося ранее исходного сырья, которое образуется при фракционировании до-

норской плазмы этанолом в процессе производства антистафилококкового иммуноглобулина, а также в оригинальном процессе выделения и дезагрегации ТАБ. Принципиальным аналогом нового препарата является полиспецифический иммунотерапевтический препарат Аффинолейкин, разработанный нами ранее [3].

Таблица 3

### Особые свойства НАСЦ

№ п/п	Свойства
1	Обладают двойной стереоспецифичностью — к антигенам и клеточным рецепторам
2	Представляют собой Т-клеточный антигенспецифичный продукт адаптивного иммунного ответа
3	Выделяются <i>ex vivo</i> при дезинтеграции и экстракции лимфоцитарных мембран или белков плазмы иммунизированного донора
4	Способны осуществлять антигенспецифичную поддержку иммунного ответа

### Материалы и методы

В качестве сырья для выделения НАСЦ использовали осадок Б (фракция III по Кону), являющийся отходом производства антистафилококкового иммуноглобулина. Для фракционирования использовалась плазма доноров, иммунизированных стафилококковым анатоксином. Содержание антиальфа-стафилолизина в донорской плазме определяли по нейтрализации гемолиза эритроцитов кролика стафилококковым альфа-токсином. Для выделения НАСЦ применяли метод дифференциальной диафильтрации на ультрафильтрационных модулях с ретенцией 30, 10 и 5 кДа. Для определения специфической активности получаемых препаратов НАСЦ пользовались методом переноса гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на мышах. Молекулярные параметры промежуточных и конечных продуктов исследовали с помощью ВЭЖХ на колонке Superdex 200 10/300 (10.0 × 300 mm). Для регистрации переноса ГЗТ были использованы кожные пробы со стафилококковым белком А (СБА), адсорбированным на алюмокалиевых квасцах, на мышах BALB/c (самцах массой 23–25 г) [1]. Перенос ГЗТ регистрировали также с помощью реакции конгломерации мышинных лейкоцитов в присутствии СБА. Оценка потенциала Стафилолейкина в терапии язвенных поражений рогавицы стафилококковой этиологии проведена на модели стафилококкового стромального гнойного кератита, воспроизведенная

на 10 кроликах породы «Шиншилла» (самцах массой 2,5–3,0 кг.).

### Результаты и обсуждение

Осадок Б антистафилококковой плазмы содержит  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулины, примесь  $\gamma$ -глобулинов и альбумина, а также липопротеиды. Для максимального перехода в раствор всех содержащихся в осадке Б белков в буфер добавляли 2М мочевины. Чтобы исключить денатурацию белков этанолом осадок гомогенизировали механически при температуре  $-6 \pm 2$  °С в течение 15–20 минут. От применения хлороформа для удаления липопротеидов пришлось отказаться из-за снижения выхода целевого продукта.

Первоначально после переосаждения сульфатом аммония ТАБ выделяли бесколоночной хроматографией на Сефакриле S-300 («Pharmacia», Superfine), а НАСЦ — дифференциальной диафильтрацией на ультрафильтрационных модулях с ретенцией 10 и 5 кДа после криодеинтеграции, закисления с помощью  $\text{CO}_2$  и центрифугирования при 14000 g. Полученный по данной схеме конечный препарат соответствовал физико-химическим характеристикам полиспецифического Аффинолейкина. Однако в следующем варианте технологии хроматография на Сефакриле S-300 была заменена микрофильтрацией и ультрафильтрацией на модулях с ретенцией 30 и 5 кДа. Полученный таким образом препарат обладал пирогенными свойствами. Он был проанализирован методом ВЭЖХ на колонке Superdex 200 10/300 (10.0 × 300 mm) (рис. 1). На хроматограмме была обнаружена зона с молекулярной массой 18 кДа, возможно, соответствующая интерлейкину 8, с которым были связаны пирогенные свойства.

В последующем была отработана новая схема получения Стафилолейкина, включающая в себя после криодеинтеграции и закисления  $\text{CO}_2$  ступенчатую диафильтрацию на ультрафильтрационных модулях с ретенцией 30 и 10 кДа и концентрирование на модулях с ретенцией 5 кДа. По данной схеме получено 3 серии препарата, удовлетворительные по следующим показателям: растворимость, прозрачность раствора, рН, цветность раствора, потеря в массе при высушивании, белок, средняя масса содержимого в ампуле, апиогенность, стерильность, специфическая активность. Стафилолейкин был проанализирован ВЭЖХ на колонке Superdex 200 10/300 (10.0 × 300 mm) (рис. 2) и электрофорезом в ПААГ с додецилсульфатом натрия. Установлена его большая гомогенность по сравнению с коммерческим Аффинолейкином (рис. 3). Молекулярная масса активного начала составляет около 6–8 кДа.

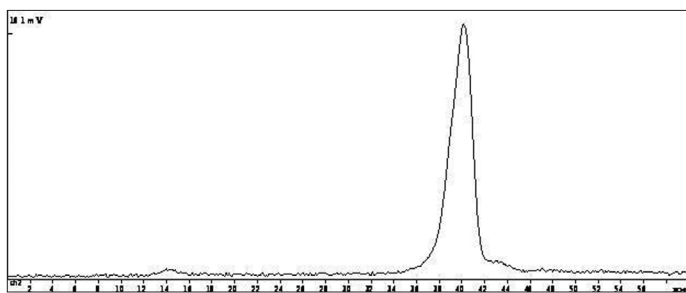


Рис. 1. Хроматограмма препарата, полученного ультрафильтрацией на модулях 30 и 5 кДа

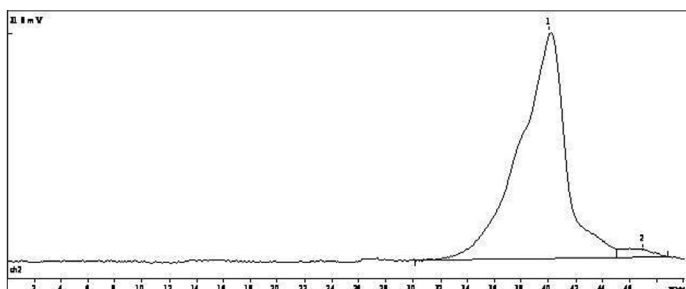


Рис. 2. Хроматограмма препарата Стафилолейкин

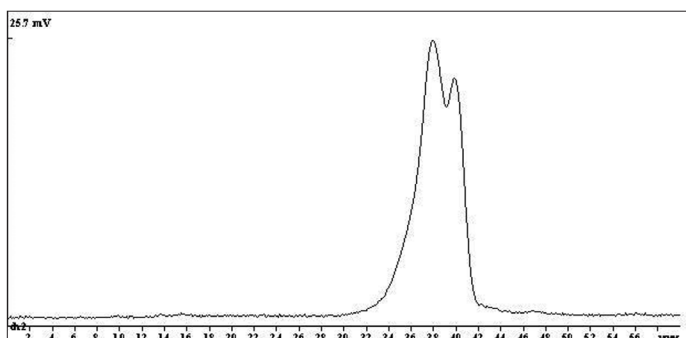


Рис. 3. Хроматограмма препарата Аффинолейкин

При сравнительной оценке Стафилолейкин и Аффинолейкин осуществляли перенос ГЗТ к СБА у мышей с похожей частотой, что свидетельствует о сходном присутствии в них НАСЦ антистафилококковой специфичности. СБА, подобно туберкулину, — классический антиген иммунологической памяти человека. В то же время он — поверхностный соматический антиген большинства вирулентных штаммов *S. aureus*, вызывающий иммунный ответ у каждого индивида с ненарушенным иммунологическим статусом. Колонизация стафилококком кожи и слизистых оболочек начинается вскоре после рождения, и эта латентная инфекция рассматривается как причина появления специфических к СБА НАСЦ, обнаруженных в данном исследовании.

Кроме того, перенос ГЗТ регистрировали с помощью реакции СБА-зависимой агрегации лейкоцитов мышей после введения Стафилолейкина. При этом активность препарата выражалась величиной его дозы в

мкг, введение которой мышам в 100 раз снижает пороговую концентрацию СБА, вызывающую агрегацию циркулирующих лейкоцитов, в сравнении с эффектом введения неспецифического иммуномодулятора — натрия нуклеината. Судя по результатам переноса ГЗТ к СБА, регистрируемого в реакции СБА-зависимой агрегации лейкоцитов мышей, Стафилолейкин и Аффинолейкин обладают этой активностью в перекрывающемся интервале доз с тенденцией увеличения активности (снижение  $D_{100}$ ) у Стафилолейкина. Препарат, приготовленный из плазмы неиммунизированных доноров, полученный по разработанной технологии, обладал значимо меньшей активностью в переносе ГЗТ к СБА (табл. 4).

Таблица 4

**Доза ( $D_{100}$ ) образцов НАСЦ, снижающая пороговую концентрацию антигенов в 100 раз в реакции агрегации мышинных лейкоцитов**

№ п/п	Образцы НАСЦ	$D_{100}$ НАСЦ1* (кг/мышь)
1	Из лимфоцитарного экстракта (Аффинолейкин)	12 (2 ÷ 16)
2	Из плазмы доноров, иммунизированных стафилококковым анатоксином (Стафилолейкин)	6 (4 ÷ 32)
3	Из нормальной плазмы	62 (42 ÷ 352)

Примечание: \* медиана и 95% доверительный интервал по Ван дер Вардену

В опытах моделирования стафилококкового гнойного кератита на кроликах после развития одинаково выраженного в опытной и контрольной группах воспаления с образованием инфильтрата в строме роговицы, в опытной группе в конъюнктивальный мешок ежедневно инстиллировали Стафилолейкин, а в контрольной — 0,9%-ный раствор натрия хлорида. Было установлено, что Стафилолейкин на неделю, по сравнению с контролем, ускорял заживление стафилококкового кератита при значимом различии балльных оценок.

Во время разработки подходов к определению активности Стафилолейкина *in vitro* с помощью иммуноферментного анализа на планшетах с адсорбированным стафилококковым белком А или стафилококковым анатоксином и стандартными препаратами антистафилококкового иммуноглобулина (ИГ) в растворе был обнаружен феномен усиления сигнала и сдвига конечной точки титрования на 1–2 лунки к концу ряда при внесении Стафилолейкина

между антигеном и антителами. То есть, в присутствии Стафилолейкина аффинность специфических антител возрастала таким образом, что критическая концентрация антител, связывающихся с антигеном, необходимая для получения регистрируемого сигнала реакции, уменьшалась и чувствительность ИФА становилась выше (рис. 4).

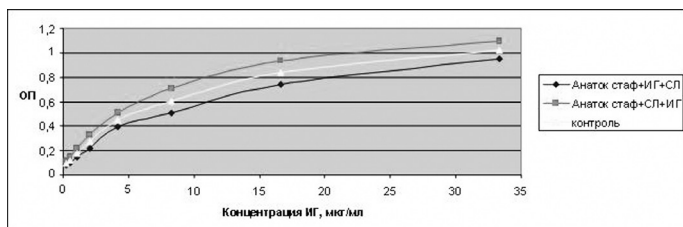


Рис 4. Влияние Стафилолейкина на результаты ИФА

### Заключение

Впервые разработана оригинальная технология получения специфического цитокинового препарата «Стафилолейкин» из отхода серийного производства антистафилококкового иммуноглобулина, включающая в себя стадии переосаждения сульфатом аммония, криодеинтеграции ТАБ и ступенчатую ультрафильтрацию для выделения и очистки НАСЦ. Разработанная технология воспроизведена в экспериментально-производственных условиях. Специфическая активность полученных экспериментально-производственных образцов препарата подтверждена в тестах ГЗТ и конгломерации лейкоцитов, а также в ИФА по увеличению аффинности антистафилококковых антител. Возможная перспективность использования Стафилолейкина для лечения язвенных

поражений роговицы показана на модели стафилококкового стромального гнойного кератита у кроликов.

### Литература

1. Бухвальд Э., Перепечкина Н.П., Салов В.Ф., Мац А.Н. Местный специфический иммунный ответ на белок А *Staphylococcus aureus* в лимфоидной ткани миндалин человека // *Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* — 1985. — № 5. — С. 78–83.
2. Мац А.Н., Боков М.Н., Кузьмина М.Н. Концепция низкомолекулярных антигенспецифических цитокинов и ее новые практические приложения // *Аллергология и иммунология.* — 2008. — № 4. — С. 444–447.
3. Мац А.Н. Природа «трансфер-факторной» активности иммунотерапевтического препарата Аффинолейкин // *Биопрепараты.* — 2004. — 4(16). — С. 7–13.
4. Мац А.Н. «Трансферфактор» — это N-концевая часть «протомера» растворимого Т-клеточного антигенсвязывающего белка // *Аллергология и иммунология.* — 2005. — Т. 6. — № 2. — С. 140–143.
5. Cone R.E., Georgiou G.M. Little CH — Soluble T-lymphocyte antigen-specific immunoproteins: a progress report // *Exp. Biol. Med. (Maywood).* — 2002. — Vol. 227(7). — P. 438–444.
6. Dumonde D.C., Kirkpatrick C.H., Pizza G. / In: Eleventh International Congress on Transfer Factors: March 1–4, 1999, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico // *J. Interferon Cytokine Res.* — 2000. — Vol. 20(4). — P. 439–441.
7. Marchalonis J.J., Schluter S.F., Edmundson A.B. The T-cell receptor as immunoglobulin: paradigm regained // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* — 1997. — Vol. 216(3). — P. 303–318.
8. Plasma Proteome Database // <http://www.plasmaproteome-database.org/>.

## PRODUCTION TECHNOLOGY OF PREPARATION «STAPHYLOLEIKIN» FROM SEDIMENT B – WASTE PRODUCTION OF DONOR'S ANTISTAPHYLOCOCCAL IMMUNOGLOBULIN

T.M. AFANASIEVA<sup>1</sup>, V.P. PETROVSKYH<sup>1</sup>, A.M. NIKOLAEVA<sup>1</sup>, A.V. KAZYANIN<sup>1</sup>, A.N. MATZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> «Biomed» — Perm Branch of Federal State Unitary Company «Microgen», Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation; <sup>2</sup> I.I.Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera RAMS, Moscow

Production technology of a therapeutic preparation named «Staphyloleikin» with antistaphylococcal orientability has been worked out. The novelty of this technology is in the use of waste production of antistaphylococcal immunoglobulin as the basic raw material, as well as in the original process of extraction and disaggregation of soluble T-cell antigen-binding proteins. The main qualities of this brand-new preparation have been investigated. The immunotherapeutic activity of «Staphyloleikin» has been demonstrated in experimental conditions.

**Keywords:** low-molecular antigen-specific cytokines, T-cell antigen-binding proteins, experimental staphylococcal purulent keratitis, transfer of delayed-type hypersensitivity to staphylococcal protein A.



## КУЛИНАРНЫЕ ФАРШЕВЫЕ РЫБНЫЕ ИЗДЕЛИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ

Н.Л. КОРНИЕНКО<sup>1\*</sup>, О.В. БРЕДИХИНА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВПО Московский государственный университет пищевых производств,

<sup>2</sup> ФГУП «ВНИРО», Москва

В работе предлагается создание композиции пробиотического назначения на основе водорослей и использование их в различных технологических обработках. Вводимая добавка представляет собой натуральный пищевой комплекс на основе морских бурых водорослей, ферментированный молочнокислыми бактериями. Предложенная пищевая композиция на основе морских бурых водорослей, ферментированных молочнокислыми бактериями, позволяет расширить ассортимент и улучшить потребительские свойства рыбных продуктов функционального питания, сбалансированных по пищевой ценности и оптимизированных по органолептическим свойствам.

**Ключевые слова:** морские бурые водоросли, ферментация молочнокислыми микроорганизмами, лечебно-профилактические свойства.

### Введение

Производство рыбного фарша является одним из основных процессов переработки рыбы, открывающим новые возможности в области рационального использования сырья и увеличивающейся доли в уловах малоценных в пищевом и технологическом отношении рыб. Фарш имеет высокую степень готовности для использования в производстве кулинарных фаршевых изделий. Производство рыбного фарша можно считать наиболее рациональным и современным способом переработки рыбного сырья [5].

Приготовление фарша из различных видов рыб и использование различных вкусовых ароматических и стабилизирующих добавок позволяют целенаправленно регулировать химический состав фарша и в целом его качество, получая рыбные продукты с заранее заданными свойствами, удовлетворяющие высокие потребительские требования. Благодаря уникальным свойствам рыбного сырья его можно использовать, в том числе для детского, геродиетического и лечебно-профилактического питания [4].

Химический состав различных видов рыб и даже одного и того же вида в зависимости от массы, места и времени вылова и других факторов существенно различается. Различия в химическом составе значительно сказываются на физико-химических, биохимических и реологических показателях рыбы и фарша из нее и должны рассматриваться во взаимосвязи при изготовлении рыбной продукции [3].

В классических рецептурах приготовления фаршевых кулинарных изделий в качестве стабилизирующих добавок, действие которых направлено на повышение вязкопластических свойств и влагоудерживающей способности фарша, в основном применялся картофельный крахмал.

В данной научной работе предлагается создание пробиотической композиции на основе морских водорослей и ее влияния на свойства рыбного фарша и готовых кулинарных изделий. Вводимая композиция представляет собой натуральный пищевой комплекс на основе растительных компонентов (морских водорослей), ферментированный молочнокислыми бактериями (рода *Lactobacillus*), сочетающий в себе естественные факторы, способствующие улучшению деятельности ферментных систем физиологических штаммов молочнокислых микроорганизмов, благодаря чему обеспечивается становление экосистемы пищеварительного тракта человека.

Рыбный фарш, как и любая другая дисперсионная система, обладает разнообразными структурно-механическими свойствами. Он представляет собой белковую дисперсионную систему, реологические свойства

© 2012 г. Корниенко Н.Л., Бредихина О.В.

\* Автор для переписки:

Корниенко Николай Леонидович  
аспирант Московского государственного  
университета пищевых производств  
109316, Москва, ул. Талалихина, 33  
Тел.: +7 (495) 677-07-90  
E-mail: nikola203@rambler.ru

которой в значительной степени определяются составом мышечных белков и их строением, содержанием воды и жира [1].

В качестве структурообразователей выделенные из водорослей альгинаты применяются только в химически чистом виде. Однако выделения из водорослей альгиновой кислоты и перевод ее в солевую форму — сложный, трудоемкий, энергоемкий и экологически небезвредный процесс. Кроме того, при выделении альгиновой кислоты теряются другие ценные компоненты водорослей, в частности, минеральные и азотистые вещества, витамины. В связи с этим представляется целесообразным использование в качестве структурообразователя не извлеченного альгината натрия, а морских водорослей, в состав которого входят альгиновая кислота, альгинаты натрия, калия и кальция [2].

### Материалы и методы

Объектом исследования служили модельные образцы рыбного фарша, изготовленные из мяса трески. При составлении рецептуры образцов применялась пробиотическая композиция на основе морских водорослей.

Исследовали связывающую способность разработанной пробиотической композиции на основе морских водорослей при внесении их в рыбный фарш из трески. При подготовке образцов рыбные фарши и морские водоросли тщательно перемешивали и определяли водоудерживающую способность (ВУС) и предельное напряжение сдвига (ПНС) на пенетрометре МТИММП до и после термической обработки.

В соответствии с поставленными целями экспериментальные исследования проводились в два этапа. На первом этапе проводился подбор рецептурных компонентов и их соотношений для модельных образцов. На втором этапе осуществлялась сравнительная органолептическая оценка термообработанных модельных образцов.

### Результаты и обсуждение

На основании полученных данных можно сделать вывод о положительном влиянии внесения пробиотической композиции на структурные свойства фарша из рыбы как до, так и после термической обработки. При увеличении содержания композиции от 0 до 40% по массе в сыром фарше ВУС повышается на 23,4%, при термической обработке — на 12,3%; выход фарша после термической обработки увеличивается на 9,2%; предельное напряжение сдвига в обоих случаях снижается [2].

Связывающая способность композиции проявляется не только при использовании фарша из свежей рыбы, когда белковые структуры находятся в нативном состоянии. Как показывают результаты исследований (табл. 1), внесение композиции в фарш из мороженой трески оказывает положительное воздействие на его структурные свойства как до, так и после термической обработки (выход фарша после термической обработки и ВУС увеличиваются, ПНС — уменьшается).

Таблица 1  
Структурные показатели рыбного фарша до и после термической обработки в зависимости от содержания композиции

Содержание композиции в фарше, % по массе	Выход фарша после термической обработки, %	ВУС, %	ПНС, Па
Фарш из свежей трески			
0	89,8	65,42/62,23	862/26503
15	92,2	72,06/66,62	810/15037
40	99,0	88,83/74,57	721/6411
Фарш из мороженой трески			
0	75,9	67,92/44,30	654/11278
20	88,2	73,90/54,68	611/7661
40	94,0	78,15/58,88	437/6252

Примечание: над чертой приведены показатели до термической обработки, под чертой — после термической обработки

Таблица 2  
Структурные показатели фарша из свежей трески до и после замораживания в зависимости от содержания композиции

Содержание композиции в фарше, % по массе	ВУС, %	ПНС, Па
0	65,42/64,53	868/1842
10	73,12/69,22	819/1842
20	82,76/73,74	810/1500
40	88,83/74,24	721/1167

Примечание: над чертой приведены данные, полученные до замораживания фарша, под чертой — после замораживания

Таблица 3

## Влияние содержания композиции в рыбном фарше на его органолептические свойства

Дозировка композиции в фарше, %	Внешний вид	Консистенция	Вкус	Запах
0	Цвет кремовый с сероватым оттенком, хорошо сохраняет форму, режется с небольшой крошкой	Плотная, сухая	Свойственный треске	Свойственный треске
2,5	Цвет серо-кремовый с незначительными вкраплениями морских водорослей, хорошо сохраняет форму и режется	Плотная	— " —	— " —
5	Цвет серовато-кремовый с вкраплениями морской капусты, хорошо сохраняет форму и режется	— " —	— " —	— " —
10	— " —	Плотная, сочная	Свойственный треске, но более нежный	Свойственный треске, но более нежный
15	— " —	Плотная, сочная, нежная	Свойственный треске с едва уловимым привкусом морских водорослей	Рыбный с едва уловимым оттенком запаха морских водорослей
20	Цвет серый с большим количеством буро-зеленых вкраплений, хорошо сохраняет форму и режется	Плотная, эластичная с незначительной липкостью	Рыбный с заметным привкусом морских водорослей	Рыбный с заметным оттенком запаха морских водорослей
25	Цвет серо-зелено-бурый, хорошо сохраняет форму, крошимость минимальная	Плотность, эластичная с заметной липкостью	Смешанный вкус рыбы и морских водорослей с неприятным ощущением слизи	Смешанный запах рыбы и морских водорослей

Исследовали влияние пробиотической композиции на сохранение структурных свойств рыбного фарша при его холодильной обработке. Композицию вносили в фарш из свежей трески. Образцы фарша после тщательного перемешивания замораживали и хранили в течение 1 месяца при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$ . Внесение композиции в рыбный фарш перед его замораживанием обеспечивает стабильность структурных свойств фарша при хранении. В таблице 2 видно, что ВУС всех образцов после месячного хранения в мороженом виде уменьшается незначительно.

Для определения оптимального содержания композиции последнюю вносили в количестве от 2,5 до 25% и исследовали физическими и органолептическими методами (табл. 3). С увеличением содержания компо-

зиции в образцах рыбного фарша влагоудерживающая способность его возрастает, а предельное напряжение сдвига уменьшается. Существенный эффект изменения структурных свойств фарша начинает проявляться при содержании композиции 5%. При этом содержание ВУС увеличивается на 6,7%, выход фарша после термической обработки — на 6,8%. Продукт имеет достаточно высокие органолептические свойства. При дальнейшем увеличении содержания композиции до 25% по массе ВУС фарша повышается на 10%, а при изменении содержания от 25 до 50% — лишь на 5%. Данные по органолептической оценке образцов свидетельствуют о том, что внесение композиции в количестве 25% по массе и более в рыбный фарш не обеспечивает получение высококачественного продукта

— появляется неприятное ощущение слизи, липкости, ухудшается внешний вид. Следовательно, оптимальное содержание композиции в рыбном фарше должно составлять 5–20% по массе [2].

### **Заключение**

На основе экспериментальных исследований можно сделать вывод, что пробиотическая пищевая композиция в рыбном фарше оказывает положительное влияние на фаршевую структуру и таким образом данная композиция улучшает реологические и органолептические показатели в готовом продукте.

### **Литература**

1. Андрусенко П.И., Лисова А.С., Попов Н.И. Технология рыбных продуктов. — М.: Агропромиздат; 1989. — 254 с.
2. Богданов В.Д., Сафронова Т.М. Структурообразователи и рыбные композиции. — М.: ВНИРО, 1993. — 172 с.
3. Борисочкина Л.И., Гудович А.В. Производство рыбных кулинарных изделий. — М.: Агропромиздат, 1989. — 312 с.
4. Маслова Г.В., Маслов А.М. Реология рыбы и рыбных продуктов. — М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. — 216 с.
5. Технология рыбы и рыбных продуктов / Под ред. проф. Ершова А.М. — М.: Колос, 2006. — 720 с.

## **CULINARY STUFFING FISH PRODUCTS USING PROBIOTIC COMPOSITION**

N.L. KORNIENKO<sup>1</sup>, O.V. BREDIHINA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Moscow State University of Food Production*, <sup>2</sup> *VNIRO, Moscow*

In this paper we proposed a composition based on the probiotic use of algae and their use in various technological treatments. Introduced additive is a natural food complex on the basis of marine brown algae, fermented lactic acid bacteria. The proposed food composition based on marine brown algae, fermented lactic acid bacteria, thus expanding the range and improve the consumer properties of fish products of functional foods, balanced on the nutritional value and optimized in terms of organoleptic properties.

*Keywords:* marine brown algae, microbial lactic acid fermentation, therapeutic and prophylactic properties.

## ОБОСНОВАНИЕ КРИТЕРИЕВ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРОИСХОЖДЕНИЯ МОРСКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ (РАЙОНОВ ПРОМЫСЛА) ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ БЕЗОПАСНОСТИ

Е.В. СЕРГИЕНКО\*, А.И. БОЧКАРЕВ, А.Г. МОСЕЙЧУК

ФГУП «ВНИРО», Москва

В обзоре с использованием собственных данных представлено научное обоснование критериев идентификации происхождения (района промысла) тюленей по показателям безопасности с целью предотвращения фальсификации видового состава тюленей, выявления возможных причин и источников загрязнений продуктов и создания базы данных для системного мониторинга и научно-прикладного обеспечения безопасности продуктов, выработанных из водных биологических ресурсов. Обоснован выбор объективного показателя, который позволяет с использованием метода регрессионного анализа разработать критерий идентификации района промысла морских млекопитающих (тюленей) и осуществлять его регулирование.

*Ключевые слова:* морская биотехнология, тюлени, район промысла, регулирование промысла, показатели безопасности, токсичные металлы, хлорорганические пестициды, радионуклиды, тюлений жир, экспресс-метод, идентификация, регрессионный анализ.

На сегодняшний день одной из основных практически важных задач, стоящих перед рыбной отраслью и требующих безотлагательного решения, является поиск дополнительных сырьевых ресурсов с целью повышения объемов выпуска качественной и безопасной пищевой и кормовой продукции.

Одним из таких источников могут служить тюлени, обитающие в основном в Тихом океане. Их мясо практически не используют в пищу, в промышленных масштабах перерабатывают только сало, используемое в технических целях [5] При этом в его составе, содержащем около 90% липидов, присутствует значительное количество биологически активных полиненасыщенных жирных кислот омега-3 и омега-6 [12] Таким образом, мясо и мясокостные ткани тюленя следует рассматривать в качестве сырья для получения пищевой и кормовой продукции, а сало — для получения пищевого жира и БАД на его основе.

При производстве различных видов пищевой и кормовой продукции актуальным представляется вопрос безопасности поступающих на переработку морских млекопитающих (тюленей), а именно: контроль содержания

токсичных металлов, хлорорганических пестицидов, а также радионуклидов в мясе, мясокостной ткани и в жире. В этой связи важен вопрос идентификации района промысла тюленей с целью определения дальнейшего направления их переработки на основании данных по показателям безопасности.

Цель настоящей работы — научное обоснование критерия идентификации происхождения (района промысла) тюленей по показателям безопасности. Полученный критерий позволит:

- предотвратить фальсификацию видового состава объектов промысла (тюленей);
- предотвратить случаи реализации продуктов, не соответствующих действующим нормативным документам и опасных для здоровья человека и животных;
- выявить возможные причины и источники загрязнений продуктов для разработки соответствующих действенных профилактических мероприятий;
- создать базу данных для системного мониторинга и научно-прикладного обеспечения безопасности продуктов, выработанных из водных биологических ресурсов.

Кроме того, научное обоснование и математический расчет критериев актуальны для совершенствования существующей системы проведения государственного мониторинга. На основании разработанного критерия могут быть охарактеризованы районы промысла. По полученным характеристикам возможно регулирование промысла в части запрета или разрешения вылова водных биологических ресурсов.

© 2012 г. Сергиенко Е.В., Бочкарев А.И., Мосейчук А.Г.

\* Автор для переписки:

Сергиенко Евгений Владимирович

к.т.н., заведующий лабораторией ФГУП «ВНИРО»

Тел.: +7 (499) 264-90-76

E-mail: bav@vniro.ru

В настоящее время в рыбной отрасли существуют несколько видов идентификации объектов промысла:

1. Идентификация по внешним признакам, основанная на визуальном анализе морфологических признаков объекта исследования, например, строению костей скелета, зубов и т.д. [14, 15] Данный вид идентификации получил широкое распространение в различных видах прикладных исследований. Однако он имеет два существенных недостатка. Во-первых, он не позволяет идентифицировать район промысла особи, так как возможна оценка только ее вида. Во-вторых, точность идентификации зависит от практического опыта и квалификации исследователя.

2. Идентификация по ДНК объекта исследования [10] В настоящее время данный метод идентификации является наиболее точным, но также имеет ряд недостатков. Как и в первом случае, он ориентирован, прежде всего, на определение вида объекта исследования, однако не дает возможность точно определить район его промысла. Проведение анализа ДНК и ее последующая идентификация, основанная на выделении белковых веществ, их последующей очистке и сравнении структуры молекулы ДНК с эталонной, представляется достаточно трудоемким процессом, требующим высококвалифицированной подготовки от исследователя. При этом необходимым условием для выполнения идентификации служит наличие сравнительной эталонной базы, которая в настоящее время для тюленей отсутствует.

3. Общеизвестен факт изменения качественного содержания липидов (их фракционного и жирнокислот-

ного состава) рыбных и нерыбных объектов промысла в зависимости от вида объекта исследования. Однако данный метод не может быть использован для определения района обитания особей, так как указанные показатели от района к району неизменны [8, 12].

Таким образом, необходима разработка экспресс-метода, основанного на проведении нетрудоемких аналитических исследований и последующем сравнении полученных результатов с эталоном. При этом показатели, по которым проводится сравнительная оценка, должны отвечать следующим требованиям:

- не изменяться при изменении условий окружающей среды — температуры, влажности и др.;
- не зависеть от сезонных изменений, происходящих с живыми организмами;
- не изменяться в процессе посмертных изменений, происходящих с живыми организмами после их вылова;
- использованные в аналитических исследованиях методы должны быть общепринятыми для рыбной отрасли и применяться исследователями невысокой квалификации.

С целью идентификации районов промысла тюленей и одновременного контроля их безопасности для человека и животных наиболее целесообразна разработка метода идентификации, основанного на регламентируемых показателях безопасности.

Регламентируемые показатели безопасности различных видов тюленей представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

**Содержание токсичных металлов и хлорорганических пестицидов  
в жире тюленей различных районов промысла**

Вид тюленя	Содержание, мг/кг					
	Свинец	Мышьяк	Кадмий	Ртуть	ГХЦГ	ДДТ и метаболиты
Байкальская нерпа (озеро Байкал)*	0,14	0,11	0,005	0,038	0,01	0,01
Каспийский тюлень (Каспийское море)*	0,31	0,001	0,001	0,001	Отсут.	Отсут.
Гренландский тюлень (СВА)*	0,19	0,2	0,09	0,04	0,12	0,01
Ларга (СВТО, СЗТО)*	0,13	0,07	0,018	0,005	0,03	0,006
Морской заяц (лахтак) (СВТО, СЗТО)	0,21	0,13	0,07	0,012	0,07	0,015
ПДК по СанПиН 2.3.2.1078.01	1,0	5,0	0,2	0,5	0,2	0,2

Примечание: \* данные Боевой Н.П. и др. [4]; ГХЦГ — гексахлорциклогексан

**Содержание радионуклидов в тюленях, выловленных  
в различных районах промысла (n=3÷5)**

Вид тюленя	Район промысла	Содержание, Бк/кг*	
		Цезий-137	Стронций-90
Ларга	СЗТО (Берингово море) СВТО (Берингово море)	0,0	0,0
Морской заяц (лахтак)	СВТО (Охотское море) СЗТО (Охотское море)	$\frac{17 \div 20}{19}$	$\frac{35 \div 41}{38}$
Каспийский тюлень	Каспийское море	$\frac{27 \div 32}{30}$	$\frac{46 \div 53}{50}$
Байкальская нерпа	Озеро Байкал	$\frac{4,0 \div 6,5}{5}$	0,0
Гренландский тюлень	СВА	$\frac{8 \div 13}{10}$	$\frac{22,5 \div 27}{25}$
ПДК по СанПиН 2.3.2.1078-01		60	80

Примечание: \* данные Боевой Н.П. и др. [4]

Из представленных данных можно заключить, что по содержанию токсичных металлов и хлорорганических пестицидов наименее загрязнен каспийский тюлень; при этом количественное содержание указанных показателей у тюленей остальных районов промысла находятся приблизительно на одинаковом уровне.

Из представленных в таблице 2 данных следует, что по содержанию радионуклидов наиболее загрязненным видом тюленя является каспийский: содержание в нем цезия-137 и стронция-90 максимально по сравнению с остальными и составляет 30 и 50 Бк/кг, соответственно. Наименее загрязнен радионуклидами вид тюленя Ларга, обитающий в Беринговом море: в исследованных особях радионуклиды не обнаружены. В то же время у морского зайца (лахтака), обитающего в Охотском море, отмечается относительно высокое содержание цезия и стронция (19 и 38 Бк/кг, соответственно).

Среди рассмотренных выше показателей безопасности — тяжелых металлов, хлорорганических пестицидов и радионуклидов, первые не могут являться объективным показателем, позволяющим идентифицировать объект промысла. Вследствие того, что тяжелые металлы могут выводиться из организма, взаимодействуя с поступающими извне нутриентами, их концентрация в живых организмах непостоянна [6, 7, 18].

Хлорорганические пестициды, напротив, не выводятся из организма, однако, как видно из данных таблицы 1, вследствие незначительного разброса данных идентификация морских млекопитающих по району промысла может быть недостоверной [3, 16, 17].

Наиболее перспективна идентификация районов промысла млекопитающих на основании данных по содержанию радионуклидов, в частности, цезия-137, что объясняется несколькими причинами.

Причинами повышенного образования радионуклидов являются техногенные катастрофы (например аварии на Чернобыльской АЭС, АЭС «Фукусима-1», аварии на заводе «Маяк»). Еще одним, не менее опасным источником радионуклидов служат материалы переработки горнодобывающей промышленности: удельное содержание в них радиоактивных изотопов незначительно, однако такие отходы представляют значительную опасность вследствие большого их количества.

Радионуклиды в виде ионов попадают в водную среду, аккумулируясь в верхних слоях почвы, откуда частично переходят в ткани растений, а также грибов. В свою очередь, с растительной пищей радионуклиды могут попадать в организмы животных, водных биологических ресурсов либо человека.

Таким образом, радионуклиды активно вовлекаются в пищевые цепи, откладываясь как в растительных, так и в животных тканях, причем около 10% радионуклидов откладываются в костной ткани и не выводятся из организма [11, 13]. Поэтому они представляют собой индикаторы загрязненности среды обитания и могут определять место обитания особи. Идентификация районов промысла морских млекопитающих (тюленей) на основании данных по содержанию радионуклидов (цезия-137) является эффективным методом, позволяющим решить поставленную задачу.

Изменение содержания цезия-137 в жире тюленей, выловленных в различных районах промысла

Вид тюленя	Район промысла	Кодированное значение района промысла (X)	Содержание цезия-137 (Y), Бк/кг	Относительное содержание цезия-137, (Y/ПДК)
Ларга	СЗТО	1	0,00	0,0000
Лахтак	СВТО	2	5,00	0,0833
Каспийский тюлень	Каспийское море	3	10,00	0,1667
Байкальская нерпа	Озеро Байкал	4	19,00	0,3167
Гренландский тюлень	СВА	5	30,00	0,5000

При построении эмпирической зависимости в качестве зависимой переменной принимало среднее значение содержания цезия-137 в жире тюленей, выловленных в различных районах промысла, отнесенное к ПДК по СанПиН 2.3.2.1078-01. При этом повторяемость аналитических исследований, в зависимости от объекта, варьировала от 3 до 5. Использование производной величины содержания цезия-137 объясняется тем, что данная форма представления результатов позволяет, основываясь на данных аналитических исследований и используя численные значения, определить возможность или, напротив, невозможность вылова тюленя в каждом конкретном районе.

В качестве независимой переменной принимались районы промысла тюленей, которым присваивались условные численные значения. Исходные данные представлены в таблице 3.

В результате регрессионного анализа полученных данных методом наименьших квадратов было получено уравнение вида [9]:

$$\frac{Y}{\text{ПДК}} = ax^2 + b, \quad (1)$$

где:

Y — содержание цезия-137, Бк/кг; Y/ПДК — относительное содержание цезия-137; x — кодированное значение района вылова согласно таблице 3; a и b — постоянные коэффициенты (a=0,020499; b=-0,012158).

Графический вид уравнения (1) представлен на рисунке 1.

Оценка точности предсказания уравнения (1) позволила установить, что коэффициент корреляции Пирсона составляет 0,998, что больше принятого 0,95. Полученная сравнительная оценка свидетельствует об удовлетворительной точности уравнения (1).

В результате оценки значимости коэффициентов уравнения регрессии (1) по t-критерию Стьюдента было установлено, что для коэффициента a он составляет 40,7; для коэффициента b — 1,73, что соответственно на 0,00003 и 0,1829 больше допустимых принятых табличных значений при соответствующих уровнях значимости. Следовательно, оба коэффициента уравнения (1) значимы [1, 2].

В результате оценки адекватности модели по критерию Фишера (F) было установлено, что он составляет 1657,07, что больше принятого табличного значения (F=3,5). Таким образом, модель адекватна и может быть использована для описания зависимости содержания цезия-137 от района промысла.

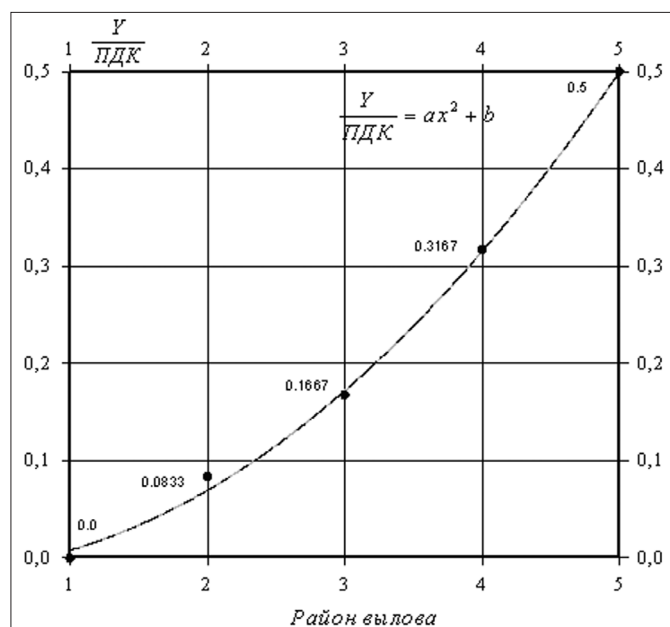


Рис. 1. Зависимость относительного содержания цезия-137 от района промысла тюленей: • эксперимент; — — — расчет



Преобразуя уравнение (1) и выражая независимую переменную через зависимую, получим:

$$x = + \left( \frac{Y}{\text{ПДК}} - b \right)^{0,5} \quad (2)$$

Полученное уравнение позволяет определить район промысла морских млекопитающих (тюленей) по содержанию в них радионуклида цезия-137. Для определения района промысла необходимо определить содержание цезия-137, затем подставив полученное значение в формулу (2), определить район промысла, сравнив полученное численное значение с данными таблицы 3.

Разработанный критерий идентификации позволяет одновременно регулировать промысел тюленей в зависимости от фактического содержания в них цезия-137. Регулирование промысла осуществляется следующим образом. При  $Y/\text{ПДК} \leq 0,5$ , то есть при  $Y \leq 30$  Бк/кг вылов объектов промысла разрешается без ограничений. При  $0,5 \leq Y/\text{ПДК} \leq 0,7$ , то есть при  $30 \leq Y \leq 42$  Бк/кг вылов проводится при контроле всех показателей качества и безопасности в соответствии с СанПин 2.3.2.1078-01. При  $0,7 \leq Y/\text{ПДК} \leq 0,9$ , то есть при  $42 \leq Y \leq 54$  Бк/кг вылов осуществляют, контролируя все регламентируемые показатели, а также с целью предотвращения загрязнения объектов промысла токсикантами, контролируют содержание последних в водной среде, причем периодичность контроля токсикантов в водной акватории составляет 1 раз в 5 дней, что в 2 раза превышает общепринятую. При  $0,9 \leq Y/\text{ПДК} \leq 1,0$  вылов прекращается.

### Заключение

На основании литературных данных и проведенных исследований показано, что количественное содержание радионуклидов в жире тюленей является объективным показателем, позволяющим разработать критерий идентификации района их промысла.

На основании данных по содержанию радионуклидов в жире морских млекопитающих (тюленей) с использованием метода регрессионного анализа разработан критерий, позволяющий идентифицировать район их промысла, а также одновременно осуществлять его регулирование.

### Литература

1. Адлер Ю.П., Маркова Е.В., Грановский Ю.В. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. 2-е изд. — М., 1976. — 279 с.

2. Ахназарова С.Л., Кафаров В.В. Методы оптимизации эксперимента в химической технологии. 2-е изд. — М.: Высшая школа, 1985. — 327 с.
3. Бобовникова Ц.И., Вирченко Е.П., Дибцева А.В., Яблоков А.В., Солнцева Г.Н., Пастухов В.Д. Водные млекопитающие — индикаторы присутствия хлорорганических пестицидов и полихлорированных бифенилов в водной среде // Гидробиол. журн. — 1986. — Т. 22. — № 2. — С. 63–66.
4. Боева Н.П., Сидоров Н.Н., Попова М.С. (Петрова М.С.). Изучение жирнокислотного состава липидов морских млекопитающих // Рыбная промышленность. — 2006. — № 3. — С. 28–29.
5. Боева Н.П. Проблема повышения эффективности зверобойного промысла / Материалы VI Международной научно-практической конференции «Производство рыбной продукции: проблемы, новые технологии, качество». — Калининград: Изд. АтлантНИРО, 2007. — С. 36–38.
6. Добровольский В.В. Глобальные циклы миграции тяжелых металлов в биосфере / В сб. «Тяжелые металлы в окружающей среде и охрана природы». Материалы 2-й Всес. конф. 1987. — М., 1988. — С. 38–41.
7. Добровольский В.В. Некоторые аспекты загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами / В сб.: «Биологическая роль микроэлементов». — М., 1983. — С. 44–46.
8. Кейтс М. Техника липидологии, выделения, анализ и идентификация липидов / Пер. с англ. В.А. Вавера. — М.: «Мир», 1975. — 322 с.
9. Клейнен Дж. Статистические методы в имитационном моделировании. Том 2. — М.: Статистика, 1978. — 335 с.
10. Мюге Н.С., Барминцева А.Е., Расторгуев С.М., Мюге В.Н., Барминцев В.А. Полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК восьми видов осетровых и разработка системы ДНК-идентификации видов // Генетика. — 2008. — Т. 44. — № 7. — С. 913–919.
11. Патин С.А. 1985. Эколого-токсикологические аспекты загрязнения морской среды. — Л.: Гидрометеоиздат, 1985. — 117 с.
12. Ржавская Ф.М. Жиры рыб и морских млекопитающих — М.: «Пищевая промышленность», 1976. — С. 198–253.
13. Яблоков А.В., Остроумов С.А. Охрана живой природы. Проблемы и перспективы. — М.: Лесная промышленность, 1983. — 269 с.
14. Evans R.D., Richner P., Outridge P.M. Micro-spatial variations of heavy-metals in the teeth of Walrus as determined by laser ablation ICP-MS. The potential for reconstructing a history of metal exposure // Arch. Envir. Contam. Toxicol. — 1995. — Vol. 28. — N 1. — P. 55–60.
15. Hashiquchi J., Akamine A., Hara Y. et al. Effects on the hard tissue of teeth in PCB poisoned rats // Fukuoka Acta Med. — 1985. — Vol. 76. — P. 221–228.
16. Norstrom R.J., Muir D.C.G. Chlorinated hydrocarbon contaminants in Arctic marine mammals // Sci. Tot. Environ. — 1994. — Vol. 154 (2–3). — P. 107–128.

17. *Ramade F.* La pollution des eaux par les insecticides organochlorines et ses effets sur la faune aquatique // *Nature*. Paris. – 1968. – N 3403. – P. 441–448.
18. *Wagemann R.* Comparison of heavy metals in two groups of ringed seal seal (*Phoca hispida*) from the Canadian Arctic // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* – 1989. – Vol. 46. – P. 1558–1563.

## **JUSTIFICATION OF THE CRITERIA FOR DETERMINING THE ORIGIN OF MARINE MAMMALS (THE AREA OF HUNTING) ON THE SAFETY PARAMETERS**

E.V. SERGIENKO, A.I. BOCHKAREV, A.G. MOSEICHUK

*VNIRO, Moscow*

The survey data using their own scientific evidence presented criteria for determining the origin of seals (area of hunting) on safety parameters to prevent falsification of the species composition of seals to identify possible causes and sources of contamination of products and create a database for system monitoring and application of scientific and safety products worked out of the water resources. The choice of objective measure, which allows the use of regression analysis to develop a criterion for identifying hunting zones of marine mammals (seals) and implement its regulation.

*Keywords:* marine biotechnology, seals, area of seal hunting, regulation of seal hunting, safety parameters, toxic metals, organochlorine pesticides, radionuclides, seal fat, express-method, identification, regression analysis.

## МОРСКИЕ БИОТЕХНОПАРКИ – СТРАТЕГИЧЕСКАЯ ЛИНИЯ РАЗВИТИЯ ПРИБРЕЖНЫХ ТЕРРИТОРИЙ ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

С.И. МАСЛЕННИКОВ\*

*Институт биологии моря имени А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток*

В обзоре обосновывается идея создания морских биотехнопарков как базисная программа экономического развития прибрежных дальневосточных территорий России. Предлагаются разработанные автором решения данной проблемы в концептуальном и организационном плане на основе реализации собственных пилотных проектов на примере марикультуры.

*Ключевые слова:* морская биотехнология, марикультура, биотехнопарки, Дальневосточный регион.

В настоящее время в Российской Федерации принята модель инерционного социально-экономического развития с минимальным планированием получаемых результатов. Эта модель основывается на единственном регуляторе — «невидимой и суперэффективной руке рынка». То есть, в виде аксиомы принимается допущение, что рыночные отношения все сами отрегулируют лучшим способом и выживут только эффективные производства и эффективные управленцы. Данная модель противопоставляется модели «неэффективного планового развития производства с назначаемым бюрократической системой аппаратом управления». Тем не менее как в странах с рыночной моделью, так и в государствах с плановой экономикой пришли к идее создания технопарков, приняв ее как удачный пример сочетания планирования, рыночного регулирования и инновационного развития. Именно технопарки позволяют сочетать необходимые качества по управлению территорией и соблюдению баланса социально-экономических интересов населения.

Объектом создания таких технопарков могут стать прибрежные морские территории, которые во всем мире играют важнейшую роль в экономическом развитии. Так, в 100-километровой полосе от морского побережья проживает около 80% экономически активного населения и производится около 70% мировой промышленной продукции. Территории на побережье дальневосточных

морей России находятся на начальном этапе своего развития. Вклад их в экономику страны незначителен. В настоящий момент при развитии территорий неизбежно возникают многочисленные «болезни роста», в том числе и по определению стратегии развития.

При тщательном анализе экономики прибрежных территорий Дальнего Востока выясняется следующее. Прибрежные биоресурсы значительно подорваны. Предприниматели лишены и сырьевой, и нормативно-правовой базы, способствующей наращиванию финансово-производственных мощностей. Слабое финансовое положение не позволяет бизнесу получить доступ ни к современным высокоэффективным технологиям воспроизводства и переработки аквакультуры, ни к современным средствам производства. Работающее на таких слабых предприятиях население не имеет социально-экономических гарантий и перспектив своего существования, что крайне негативно сказывается как на качестве, так и на производительности труда, а значит — на социально-экономической состоятельности предприятия в части обеспечения прав и свобод человека, создания приемлемых условий труда. Негосударственные организации отмечают отсутствие устойчивого тренда на соблюдение основных прав и свобод человека, отсутствие четкой природоохранной стратегии. Проекты экономического развития территорий нередко входят в противоречие с природоохранными целями. Финансово-кредитный сектор не видит гарантий для выдачи финансовых ресурсов из-за неразвитости и экономической слабости предприятий и производств. Силловые ведомства не имеют четкой и ясной законодательной базы для осуществления своей деятельности, а трактовка подобных правовых актов зачастую столь широка, что приводит к конфликтам

© 2012 г. Масленников С.И.

\* **Автор для переписки:**

Масленников Сергей Иванович

к.б.н., руководитель Центра аквакультуры и прибрежных ресурсов  
Института биологии моря имени А.В. Жирмунского ДВО РАН

690041 Владивосток, ул. Пальчевского, 17

Тел.: +7 (4232) 31-09-12 офис 224

с предпринимательскими кругами и уменьшает гарантии для инвесторов (бюрократические риски). В том числе и по этой причине аппарат госуправления не может обеспечить занятость и не получает достаточных средств в виде налоговых поступлений для формирования бюджета и выполнения социальных обязательств государства.

Одним из наиболее перспективных направлений развития прибрежных территорий представляется концепция морского биотехнопарка (МБТП). В рамках этой концепции предлагается реализация инфраструктурного проекта, основанного на объединении уже существующих предприятий аквакультуры и восполнении пробелов в научно-производственной кооперации отрасли. Кроме того, предварительные расчеты показывают высокую социальную значимость предлагаемого подхода к решению проблемы развития прибрежных территорий, как в плане создания новых рабочих мест, так и в области рационального природопользования.

Какие региональные проблемы будут решены с созданием морского биотехнопарка? Прежде всего:

- технопарк позволит гармонизировать отношения внутри общества, сгладить либо преодолеть противоречия между социальными группами, обеспечить регион конкурентоспособным высокотехнологичным производством, опирающимся на возобновляемые природные ресурсы;

- население получит гарантированную круглогодичную занятость, с обеспечением вторичного спроса на товары и услуги. Причем социальное ядро парка обеспечит закрепление молодежи как наиболее мобильной части социума;

- предприниматели получают благоприятную среду с защитой от бюрократических рисков и системой оформления производства по принципу одного окна;

- финансовый сектор получит мощного гаранта за счет целевого объединения ресурсов;

- научно-технологический сектор получит полигон для внедрения и защиты прав интеллектуальной собственности;

- сектор образования получит четкий сигнал на подготовку и переподготовку кадров нужной и главное — востребованной квалификации;

- силовые структуры получают возможность работы с единым представителем бизнеса с возможным урегулированием протоколов контрольных процедур;

- аппарат управления получит возможность направления бюджетных и административных ресурсов на развитие социальной среды и стимулирование про-

мышленного производства на подопечной территории за счет развития необходимой инфраструктуры.

Представляется, что основой морского биотехнопарка должны стать несколько структурных единиц, обеспечивающих его устойчивую деятельность и развитие.

Учитывая, что главной сферой деятельности МБТП представляется марикультура [1–5] и глубокая комплексная переработка морского сырья, одной из таких базовых структур должен быть береговой комплекс по получению посадочного материала для хозяйств марикультуры. В этом случае, получая жизнеспособный посадочный материал, хозяйства марикультуры сокращают технологический цикл по товарному выращиванию на 6–12 мес. Это серьезная страховка от климатических рисков при этой операции. Получение посадочного материала (молодь моллюсков, иглокожих и ракообразных, рассадка водорослей, мальки рыбы) является наукоемкой, высокотехнологичной частью технологий марикультуры. И здесь необходимо привлечение высокоспециализированных специалистов, которые на сегодняшний день попросту отсутствуют в рыбном и сельском хозяйстве, но вполне могут быть подготовлены на базе соответствующих НИИ.

Вторым ядром парка должен стать комплекс по первичной переработке водного сырья (процессинговый центр) с последующей глубокой обработкой. Именно на этот береговой комплекс должна поступать большая часть марикультурного сырья от предприятий аквакультуры, объединенных в рамках биотехнопарка. Процессинговый центр — это место сосредоточения современного научного и производственного оборудования, здесь должны быть сертифицированные обрабатывающие линии, позволяющие получать продукт, соответствующий стандартам качества мирового уровня.

Процессинговый центр обеспечивает первичную переработку продукции аквакультуры и ее дальнейшее распределение по различным направлениям: и непосредственно в торговую сеть, и на дополнительную переработку в биологически активные вещества и добавки, корма и субпродукты, а также в центры глубокой переработки (производство и разработка медицинских препаратов и т.д.). Для обеспечения этой деятельности процессинговый центр должен иметь свои складские помещения (в том числе холодильные площади) и логистическое подразделение. Немаловажно, что кроме сырья, получаемого от предприятий аквакультуры как от структурных подразделений морского биотехнопарка, центр обработки сможет принимать сырье и от рыбодобывающих компаний.

В целом типовая структура современного морского биотехнопарка включает в себя организованные по сетевому принципу следующие блоки:

- Центр мониторинга и охраны морской акватории.
- Центр воспроизводства и культивирования.
- Центр координации НИОКР по всем направлениям.
- Предприятия марикультуры.
- Центр переработки, хранения, сортировки и упаковки морского сырья.
- Управляющие компании (компания строительства и ремонта, логистическая компания, маркетинговый центр, лизинговая компания по оборудованию и др.).

Наиболее оптимальным территориальным размещением основного научно-производственного ядра морского биотехнопарка — центра воспроизводства и культивирования вместе с базами предприятий марикультуры — являются островные территории.

Реализация концепции морского биотехнопарка потребует выделения наземных территорий для создания промышленной зоны по воспроизводству и жилой зоны для сотрудников центра и базы марикультуры. Размещение социальной инфраструктуры биотехнопарка на островных территориях позволит обеспечить нормальное функционирование всех структурных подразделений биотехнопарка. Наиболее оптимальным вариантом размещения основных подразделений парка представляется район поселения Старк на о. Попова. На материковой части территории Владивостоке предполагается разместить промышленно-складские мощности и офисные помещения для управления компанией.

Также необходимо выделение морской акватории и береговой линии для размещения предприятий марикультуры в пределах архипелага Евгении (островные территории г. Владивостока), акваторий в западной части Залива Петра Великого.

Подобный подход может быть реализован на территориях, расположенных вдоль Российского побережья Японского и Охотского морей, а также на восточном побережье полуострова Камчатка (рис. 1).

Согласно прогнозам, создание сети подобных морских биотехнопарков даст значительный рост биотехнологической продукции на территории ДФО и позволит обеспечить работой порядка миллиона рабочих мест (табл. 1).

Эти рабочие места будут обеспечены стабильными источниками возобновимого морского биологического сырья, востребованность продукции из которого на мировых рынках имеет четкую тенденцию к росту. Уда-

ленность от центров крупных коммуникаций, таких как южные порты Приморского края, ничуть не умаляет идею парков.

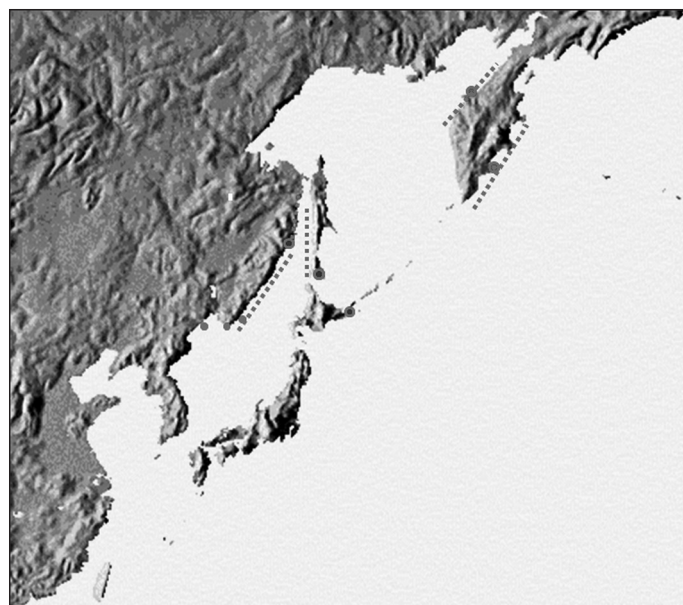


Рис. 1. Схема создания биотехнопарков на побережье ДФО. Биотехнопарки обозначены пунктиром

Создание парков предполагает получение продуктов с максимальной добавочной стоимостью. Для удаленных прибрежных территорий Дальнего Востока России проблема перевозки получаемого сырья стоит чрезвычайно остро. Опыт уловов лососей в 2011 году наглядно показал неразвитость логистической инфраструктуры. Выработка из сырья готовой продукции даст возможность значительно уменьшить транспортные проблемы с одновременным увеличением доходности и стабильности экономики побережья.

Таблица 1

**Общие данные по прогнозируемой продуктивности акватории и количеству создаваемых рабочих мест при развитии хозяйств марикультуры**

	Урожайность, т	Рабочие места
Приморский край	627600	188300
Хабаровский край	700100	210000
Сахалинская область	2255900	676800
Всего по региону:	3583600	1075100

Морская удаленность в данном случае приблизит конечную продукции к потребителю, поскольку хорошо известно, что морская доставка остается одной из самых эффективных.

Очевидно, что без прямой государственной поддержки, усилиями только научно-образовательного и делового сообщества здесь не обойтись. Поэтому для обеспечения эффективной деятельности МБТП органами государственной власти Российской Федерации и региональными администрациями субъектов ДВФО должны применяться прямые и косвенные меры стимулирования выполнения инновационных проектов, прошедших конкурсный отбор. Это такие меры, как льготы по налогам, целевые дотации, субсидии и кредиты на льготных условиях, что позволит сформировать привлекательную среду для участия в деятельности МБТП негосударственных средств.

Полагаем, что сочетание государственной поддержки, наличие серьезного научно-образовательного потенциала и высококвалифицированных специалистов в сфере развития аквакультуры и прибрежных территорий позволят создать в Приморском крае и на Дальнем Востоке России систему морских биотехнопарков, благодаря которым будет сделан серьезный шаг в социально-экономическом и научно-технологическом развитии региона.

## Литература

1. Масленников С.И., Корнейчук С.К. Сценарии развития марикультуры / Актуальные проблемы освоения биологических ресурсов Мирового океана: Материалы международной научно-технической конференции. Владивосток, 18–21 мая 2010 г. Ч. 1. Водные биоресурсы и экология, аквакультура и промышленное рыболовство. – Владивосток: Дальрыбвтуз, 2010. – С. 80–82.
2. Масленников С.И. Перспективы развития марикультуры: проблемы и пути их решения / Природа без границ: Материалы I Международного экологического форума. Владивосток, 7–9 июня 2006 г. – Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. – Ч. 1. – С. 261–267.
3. Масленников С.И. Пути развития марикультуры на Дальнем Востоке РФ // Экологический вестник Приморья. Владивосток. – 2008. – № 1. – С. 4–8.
4. Платонов А.Г., Масленников С.И., Арзамасцев И.С. Аквакультура в Приморском крае: проблемы и перспективы // Рыбное хозяйство. – 2009. – № 5. – С. 29–30.
5. Maslennikov S.I. Marine Biological Resources in the Far Eastern Coast: Their Rational Use from Ecological and Economic Viewpoints / Energy and environment in Slavic Eurasia: toward the establishment of the network of environmental studies in the Pan-Okhotsk region. – Sapporo: Slavic Research Center, Hokkaido University, 2008. – P. 89–125.

## MARINE BIOTECHNOLOGY PARKS – A STRATEGIC LINE OF DEVELOPMENT OF COASTAL AREAS OF THE FAR EAST

S.I. MASLENNIKOV

*A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology of FEB RAS, Vladivostok*

The review substantiates the idea of creating a base of marine biotechnology parks program for economic development of coastal areas of the Far Eastern Russia. Developed by the author offers solutions to this problem in the conceptual and organizational terms, based on the realization of their own pilot projects on the example of mariculture.

*Keywords:* marine biotechnology, mariculture, biotechnology parks, Far East region.

## ПЕРСПЕКТИВЫ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ПРАВОВОГО РЕГУЛИРОВАНИЯ В ОБЛАСТИ БИОТЕХНОЛОГИИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Ю.А. ПЕТУШКОВА\*

*Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

В обзоре рассматриваются актуальные вопросы правового регулирования в сфере биотехнологии в России. Акцент делается на сравнение зарубежных и отечественных юридических норм. Подчеркиваются нерешенные вопросы, даются предложения по совершенствованию нормативно-правовой базы.

*Ключевые слова:* биотехнология, правовое регулирование, Российская Федерация.

**Роль правового регулирования в области биотехнологии.** Как провозглашено в преамбуле Картахенского протокола по биобезопасности, современная биотехнология открывает огромные возможности для повышения благосостояния людей, если ее развивать и использовать с соблюдением соответствующих мер безопасности в отношении окружающей среды и здоровья человека [5].

Очевидно, что обоснованные и закреплённые на законодательном уровне ограничения в сфере биотехнологии необходимы с целью обеспечения экологических прав граждан на благоприятную окружающую среду. Однако введение таких ограничений должно быть в тех пределах, чтобы данная отрасль имела возможность развиваться.

Причины, по которым интересы экологической безопасности должны лежать в основе правового регулирования в области биотехнологии, а ее гарантии — составлять центральное звено соответствующей нормативной правовой базы, очевидны из положений Федерального закона «Об охране окружающей среды», согласно которым, любое производство подпадает под принцип презумпции экологической опасности планируемой хозяйственной или иной деятельности (ст. 3). Кроме того, биотехнология подразумевает использование живых организмов, которые, наряду с их генетическим фондом, напрямую представляют собой объекты охраны окружающей среды (ст. 4) [4].

Главной проблемой правового регулирования в области биотехнологии, характерное не только для Российской Федерации, но и для всех, в первую очередь, развитых стран, является активное развитие отрасли, возникновение новых правоотношений, сфер применения и неизбежность постоянных изменений и дополнений в текущее законодательство ввиду потенциальной угрозы экологической безопасности. С бурным развитием биотехнологии прибавляются новые, ранее не учитываемые, экологические риски, а, следовательно, должна постоянно совершенствоваться соответствующая правовая база.

Ввиду того, что биотехнология подразумевает использование живых организмов, а также внедрение в природные экосистемы, это может повлиять на устойчивость последних, то есть возникает вероятность их изменения и нарушения закономерностей их функционирования. В таких случаях окружающая среда теряет характеристику благоприятной. Конституционное право человека и гражданина РФ на благоприятную окружающую среду, а также на достоверную информацию о ее состоянии обеспечивается вследствие принятия соответствующих законов и подзаконных актов. Точно так же должно ограничиваться и право владения, пользования и распоряжения живыми организмами в ходе биотехнологической деятельности, так как они в этом случае являются природными ресурсами и могут использоваться собственниками свободно, только если это не наносит ущерба окружающей среде.

Принципы правового регулирования в области биотехнологии должны базироваться, прежде всего, на положениях Конституции РФ и источниках международного права в данной области.

**Основные источники международного права в сфере биотехнологии.** В области биотехнологии принято два международных правовых акта, которые

© 2012 г. Петушкова Ю.А.

\* Автор для переписки:

Петушкова Юлия Алексеевна,

к.б.н., н.с. каф. биоинженерии,

биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

Тел. +7 (985) 727-53-53.

E-mail: jupponline@gmail.com

можно считать базовыми. Один из них — Конвенция о биологическом разнообразии (Рио-де-Жанейро, 1992) [6], ратифицированная РФ [3], и Картахенский протокол по биобезопасности к этой конвенции (Монреаль, 2000) [5], который Россия не ратифицировала.

Конвенция о биологическом разнообразии наложила на РФ ряд обязательств в области биотехнологии, которые условно можно поделить на две группы. Первая группа обязанностей — обязанности по содействию распространению полезных биотехнологий, вторая — обязанности принятия мер во избежание неблагоприятных экологических последствий. В таблице 1 приведены такие обязанности и обозначена предположительная цель их установления.

Картахенский протокол по биобезопасности был разработан, как оглашено в преамбуле, с целью контроля над трансграничным перемещением любого живого измененного организма, который может оказать неблагоприятное воздействие на биологическое разнообразие. Опасность такого изменения связана с тем, что методы, используемые современной биотехнологией, позволяют преодолеть естественные физиологические репродуктивные или рекомбинационные барьеры. К ним относятся методы *in vitro* с использованием рекомбинантной ДНК, прямую инъекцию нуклеиновых кислот в клетки и методы, основанные на слиянии клеток с разным таксономическим статусом (ст. 3).

Таблица 1

**Основные обязанности Российской Федерации в области биотехнологии как Договаривающейся стороны Конвенции о биологическом разнообразии**

Обязанность (положение)	Конкретная цель исполнения	Статья
<b>Обязанности по содействию распространению полезных биотехнологий</b>		
стремиться создавать условия для облегчения доступа к генетическим ресурсам	расширение имеющихся в мире возможностей для решения проблемы утраты биоразнообразия	п. 2, ст. 15
предоставлять и/или облегчать другим Сторонам доступ к биотехнологиям, способствующим сохранению и устойчивому использованию биологического разнообразия и при этом не наносящим существенного ущерба окружающей среде	развитие и передача полезных биотехнологий	п. 1, ст. 16
обеспечивать эффективное участие в биотехнологических исследованиях тех Сторон, которые предоставляют для них генетические ресурсы	поддержка развития биотехнологии в других странах	п. 1, ст. 19
способствовать обеспечению приоритетного доступа на справедливой и равной основе Договаривающимся Сторонам к результатам и выгодам, вытекающим из биотехнологий, основанных на предоставленных ими генетических ресурсах	уравнять в правах стороны, проводящие биотехнологические исследования, и собственников, используемых генетических ресурсов	п. 2, ст. 19
<b>Обязанности принятия мер во избежание неблагоприятных экологических последствий</b>		
устанавливать контроль и ограничить риск, связанный с использованием и высвобождением живых измененных организмов*, которые могут иметь вредные экологические последствия	устойчивое использование биологического разнообразия с учетом опасности для здоровья человека	Ст. 8 g
предотвращать интродукцию и уничтожать чужеродные виды, которые угрожают экосистемам, местам обитания или исконным видам	сохранение <i>in situ</i> экосистем, поддержание видов в их естественных условиях	Ст. 8 h
принимать меры в области использования биологических ресурсов	свести к минимуму неблагоприятное воздействие на биологическое разнообразие	Ст. 10 b
участвовать в разработке процедур в области безопасной передачи, использования и применения любых живых измененных организмов	предотвратить неблагоприятное воздействие на окружающую среду	п. 3, ст. 19
предоставлять Стороне, в которую передаются измененные организмы, всю имеющуюся информацию о правилах использования и технике безопасности при работе с ними и об их потенциально вредном воздействии	предотвратить неблагоприятное воздействие на окружающую среду	п. 4, ст. 19

*Примечание:* \* означает любой живой организм, обладающий новой комбинацией генетического материала, полученного благодаря использованию современной биотехнологии



Картахенский протокол по биобезопасности предусматривает три возможных варианта использования живых измененных организмов [5]:

- а) для непосредственного использования в качестве продовольствия или корма, либо для обработки (ст. 11, 18);
- б) для транзита и использования в замкнутых системах, то есть в пределах установки или иной физической структуры при наличии эффективного ограничения контакта с внешней средой и воздействия на нее (ст. 3, 6, 18);
- в) для преднамеренной интродукции (выпуска) в окружающую среду (ст. 18).

В зависимости от предполагаемого варианта предназначения использования измененного организма закон предполагает различные требования к информации о нем и к процедуре разрешения его импорта.

Несмотря на то, что Россия в Протоколе не участвует, статья 24 предусматривает возможность трансграничных перемещений живых измененных организмов между Сторонами Протокола и странами, не участвующими в Протоколе, в том числе Российской Федерацией. Стороны могут заключать с ними двусторонние договоры, но только в соответствии с целью Протокола, состоящей, согласно статье 1, в содействии обеспечению надлежащего уровня защиты в области безопасной передачи, обработки и использования живых измененных организмов с учетом рисков неблагоприятного воздействия на биоразнообразие и здоровье человека [5].

Таким образом, если Россия захочет осуществить экспорт ГМО в одну из стран — Сторон Протокола, ей не удастся избежать прохождения всех процедур и выполнения всех обязательств, установленных в Протоколе.

Причины, по которым Россия не присоединяется к Протоколу, вероятно, обусловлены следующими мотивами:

- отсутствием детального регулирования хозяйственного оборота ГМО в национальном законодательстве и необходимостью в срочном порядке его принятия в соответствии с международными стандартами;
- необходимостью принятия внутренних мер, направленных на недопущение трансграничных перемещений измененных организмов, в том числе путем введения санкций за соответствующее правонарушение (п. 1, ст. 25);
- в случае незаконного трансграничного перемещения затронутая Страна может потребовать от

Стороны происхождения, чтобы она удалила за свой счет соответствующий живой измененный организм путем репартации или уничтожения (п. 2 ст. 25);

- никакие оговорки к Протоколу не допускаются (ст. 38).

Россия, вероятно, могла бы принять его с определенными оговорками в случае такой возможности. В настоящее время остается учитывать требования Протокола при развитии национального законодательства с тем, чтобы обеспечить возможность своего вступления в данное международное соглашение.

**Характерные особенности российского правового регулирования в сфере биотехнологии.** Правовое регулирование в Российской Федерации в сфере биотехнологии в контексте экологической безопасности имеет следующие особенности:

- Нормативная правовая база не охватывает все сферы современной биотехнологии, затрагивая некоторые из них только косвенно.

- Специализированное законодательство по биотехнологии в настоящее время включает в себя только три Федеральных закона: ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» (1996 г.), ФЗ «О государственной геномной регистрации в РФ» (2008 г.), ФЗ «О временном запрете на клонирование человека» (2002 г.).

- Законодательство устанавливает, в основном, только общие принципы правового регулирования данной сферы.

- Правовое регулирование происходит, главным образом, на уровне подзаконных актов, причем среди последних преобладают ведомственные нормативные правовые акты.

- Нормативная правовая база не предусматривает конкретных требований и стандартов в области биотехнологии в контексте экологической безопасности, а методические указания, которыми руководствуются граждане и организации, осуществляющие деятельность в области биотехнологии, носят рекомендательный характер, что препятствует установлению составов экологических правонарушений в связи с осуществлением деятельности в области биотехнологии.

- Информация об использовании продуктов биотехнологии, в частности, ГМО, не находится в открытом доступе для граждан РФ, что ставит под сомнение реализацию гарантии конституционного права человека и гражданина на достоверную информацию о состоянии окружающей среды.

- Законодательство в сфере охраны окружающей среды не предусматривает положения о регулировании выпуска ГМО в окружающую среду и другие направления биотехнологии, влекущие риски возникновения угрозы экологической безопасности.

До настоящего времени нормативная правовая база в сфере современной биотехнологии развивалась достаточно медленно. На рисунке 1 представлена динамика нормотворчества в области биотехнологии в РФ, в которой учитывались только специализированные в данной сфере правовые акты.

После 2008 г. ни одного специализированного в области биотехнологии нормативного акта принято не было. Примечательно, что, несмотря на декларативный характер федеральных законов, требующих детализации практически всех положений, принятие законов не влекло всплеска нормотворчества на уровне подзаконных актов. Подзаконные акты в данном случае принимаются не с

целью детализирования норм законодательства, а с целью заполнения в нем пробелов.

Очевидно, что нормативная правовая база в области биотехнологии будет развиваться. Следует отметить, что, в отличие от Швейцарии, Испании, Франции и большинства других стран Европы, Россия, во-первых, не связана международными обязательствами перед Европейским Союзом, а, во-вторых, не выступает Стороной Картахенского протокола по биобезопасности, являющегося основным международным правовым актом, регулирующим сферу биотехнологии. С одной стороны, это дает России самостоятельность и независимость в нормотворчестве, но, с другой стороны, приводит к тому, что внешние стимулы для развития правовой базы в этой сфере отсутствуют, нормативные правовые акты принимаются нерегулярно и произвольно, оставляя многие направления деятельности в области биотехнологии за рамками правового поля.

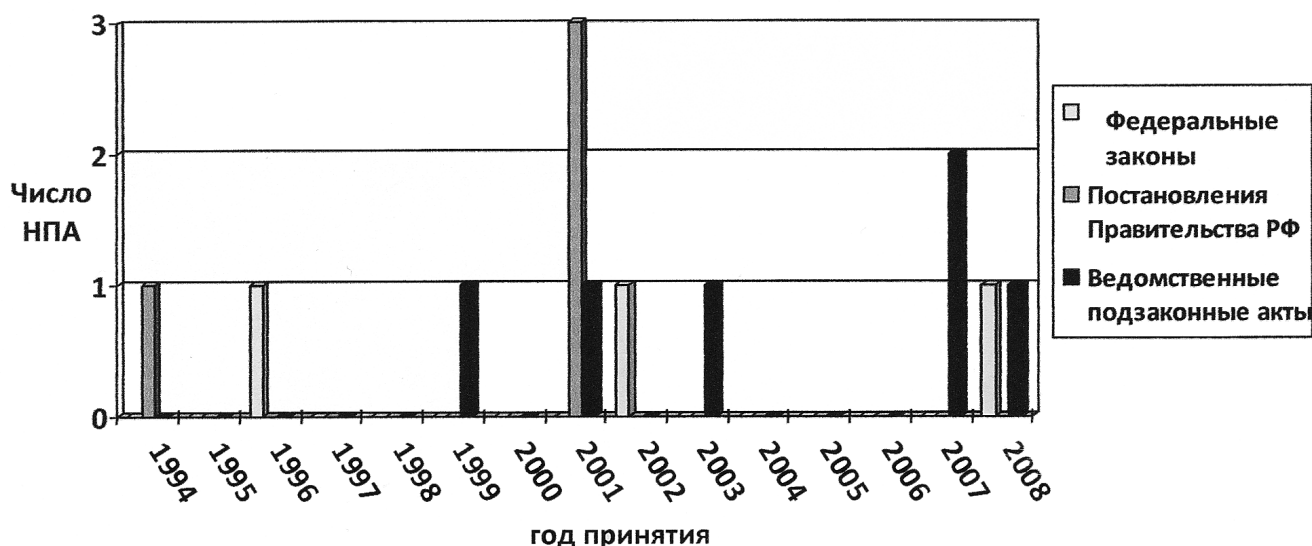


Рис 1. Динамика нормотворчества в области биотехнологии в Российской Федерации (число специализированных нормативных правовых актов – НПА, принятых с 1994 г.)

Развитие нормативной правовой базы идет в двух направлениях: совершенствования законодательства и принятия подзаконных актов. В свою очередь, совершенствование законодательства заключается не только в принятии поправок к действующим федеральным законам, но и разработке новых законов, регулирующих цели отдельные направления.

В частности, не охвачено правовым регулированием область, связанная с применением биомедицинских технологий. Проект этого закона уже разработан и активно обсуждается [2]. Закон призван регулировать

отношения в связи с разработкой, доклиническими исследованиями, экспертизой, государственной регистрацией биомедицинских клеточных технологий, а также производством, хранением и утилизацией клеточных продуктов. Примечательно, что в проекте закона не сформулированы цели правового регулирования данной сферы. Очевидно, что клеточные биомедицинские технологии используются впоследствии, в частности, для адресной доставки лекарственных средств в организме человека, то есть цель разработки и применения биомедицинских технологий — лечение тяжелых заболеваний.

Несмотря на это, закон вводит ряд ограничений на их применение: клеточные биомедицинские технологии подлежат обязательной государственной регистрации (ст. 15), в ходе которой соискатель должен предоставить детальную информацию о разработанной технологии, вслед за чем идет обязательная экспертиза (ст. 25, 26). Основанием для отказа в регистрации является решение уполномоченного федерального органа о том, что: а) эффективность клеточного продукта не подтверждена полученными данными или б) что риск причинения вреда здоровью человека вследствие его применения превышает эффективность (ст. 27) [2].

В результате единственной задачей правового регулирования в данной области, по сути, является обеспечение безопасности клеточного продукта, то есть снижение риска причинения вреда здоровью человека вследствие применения клеточных биомедицинских технологий. Эта задача оправдывает ограничения, связанные со сложной разрешительной процедурой, однако вызывает вопрос другое основание отказа в регистрации — неподтвержденная эффективность. При этом закон не вырабатывает четких критериев ее оценки. В связи с этим, когда, как планируется, закон вступит в силу, может произойти снижение активности разработчиков биомедицинских клеточных технологий в связи с препятствием для допуска к использованию тех технологий, эффективность которых не признана, хотя и риск причинения вреда здоровью тоже не подтвержден.

Директор Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России, член-корреспондент РАМН А.Г. Румянцев прокомментировал проект закона в интервью «Российской газете» следующим образом. Он подчеркнул необходимость принятия закона, без которого «клиники вынуждены работать на правовом поле со ссылкой на законодательство других стран»; кроме того, «его принятие должно способствовать прекращению незаконного изготовления и оборота клеточных материалов». Из недостатков документа он выделил три основных. Во-первых, он — противник того, чтобы технологии были предметом законодательства, так как все возможные технологии в законе прописать и зарегистрировать нельзя, а обобщение на уровне биомедицинских клеточных технологий может ограничить свободу научных исследований. Во-вторых, закон отнес экспертизу к компетенции федерального органа исполнительной власти, но при этом «кадров для экспертизы в стране пока нет». В-третьих, спорным моментом является страхование пациентов, к которым применяются клеточ-

ные продукты, с учетом их смертельных онкологических диагнозов и наследственных патологий [1].

Это один из примеров того, насколько сложно вводить новые правовые нормы, регулирующие деятельность в области биотехнологии, с целью обеспечения экологической безопасности и безопасности для здоровья человека, не оказывая при этом сдерживающего эффекта на развитие биотехнологии в целом и закрывая возможность разработки отдельных полезных технологий, в частности.

**Пробелы в правовом регулировании биотехнологической отрасли в России, выявленные на основании сравнительного анализа нормативной правовой базы зарубежных стран и Российской Федерации.** Несмотря на трудности, возникающие в ходе разработки законодательства в области биотехнологии, очевидно, что все ее направления должны реализовываться в правовом поле. С целью выявления пробелов в российской нормативной правовой базе был проведен сравнительный анализ правового регулирования изучаемой сферы в Швейцарии и России, результаты которого представлены в таблице 2.

Из таблицы 2 видно, что большинство положений, регулирующих сферу биотехнологии, в Швейцарии не только декларируется, но и имеет детально проработанную правовую базу, в то время как в России базовые положения просто декларируются, но, ввиду отсутствия детальной проработки, не могут быть реализованы на практике.

В большей степени это касается правовой базы в связи с охраной окружающей среды и обеспечением экологической безопасности в области биотехнологии. Несмотря на наличие в Российской Федерации ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности», некоторые аспекты, в частности, порядок экспорта и импорта ГМО, остались за рамками законодательного регулирования.

Направление в области правового регулирования геномной регистрации в РФ разработано лучше других направлений, затрагивающих сферу биотехнологии. С целью ограничения противоправного проведения секвенирования ДНК человека Швейцария регламентирует порядок разрешения на сделки купли-продажи с оборудованием по ДНК-диагностике.

В России вводить ограничения в сфере обращения на рынке специализированного оборудования недопустимо, так как это может создавать препятствия лицам, осуществляющим работу по секвенированию ДНК с другими целями.

**Направления и особенности правового регулирования  
в области биотехнологии в России и Швейцарии**

Сфера правового регулирования	Положение	Швейцария	РФ
Охрана окружающей среды и экологическая безопасность	Создание, разведение, вовлечение в хозяйственный оборот и использование генетически модифицированных позвоночных животных ограничено	+	±
	Использование генетически модифицированных патогенных форм в открытых системах может осуществляться, только если они сами и их метаболиты не могут вызывать угрозу окружающей среде	+	±
	Фитосанитарная и биоцидная продукция и ее производство допускаются только при отсутствии риска воздействия на живые организмы и почвенные экосистемы	+	±
Генно-инженерная деятельность	Причинение существенного вреда человеку, животным или окружающей среде вследствие преднамеренного нарушения законодательства о ГМО влечет уголовную ответственность	+	-
	Жесткие требования к документации и информации при импорте и экспорте ГМО	+	-
	Размещение ГМО на рынок строго регламентируется	+	±
	Открытый доступ к информации о ГМО, подлежащем выпуску в окружающую среду	+	-
Клонирование, трансплантология и биомедицинские клеточные технологии	Суррогатное материнство не допускается	+	-
	Технологии искусственного оплодотворения допускаются, только если пара состоит в браке, учитывается здоровье и благосостояние родителей	+	-
	Запрещается торговля органами, тканями и клетками	+	±
	Применение технологий искусственного оплодотворения без соответствующей лицензии влечет уголовную ответственность	+	-
	Клонирование человека и животных влечет уголовную ответственность	+	-
	Клонирование организмов не в целях клонирования человека разрешается	-	+
Геномная регистрация	Ограничивается оборот оборудования и для проведения <i>in vitro</i> ДНК-диагностики	+	-
	По общему правилу геномная регистрация — добровольная	+	+
	Обязательна для лиц, совершивших умышленное преступление против жизни или половой неприкосновенности	+	+
	Обязательна для лиц, совершивших умышленное преступление, если наказание предусматривает лишение свободы на срок более одного года	+	-
Пищевая промышленность	Требования к обязательной маркировке продукции, содержащей или изготовленной из ГМО	+	+
	Не подлежащий декларации предел присутствия ГМО в пищевой продукции по технологически неизбежным причинам равен 0,9%	+	-

*Примечание:* условные обозначения, приведенные напротив каждого анализируемого положения, обозначают следующее: «+» декларируется и имеет детально разработанную правовую базу; «±» декларируется, но нуждается в детальной проработке; «-» не предусмотрено

Направление, связанное с внедрением достижений биотехнологии в медицине, напротив, имеет преимущества именно в России по сравнению со Швейцарией. Полный запрет клонирования не только человека, но и животных, сложная процедура получения разрешения на искусственное оплодотворение вызывают много противоречивых вопросов. На данный момент — это единственная сфера в области биотехнологии, в которой Россия имеет некоторое преимущество вследствие недоработанной базы ее правового регулирования.

Остальные же направления нуждаются в скорейшем развитии четкой и детальной нормативной правовой базы, отсутствие которой создает угрозу экологической безопасности.

**Предложения по совершенствованию нормативной правовой базы Российской Федерации в области биотехнологии с учетом опыта зарубежных стран.** С целью совершенствования нормативной правовой базы Российской Федерации в области биотехнологии в контексте экологической безопасности, принимая во внимания опыт зарубежных стран, можно сформулировать рекомендации общего характера, а также внести конкретные предложения по правовому регулированию в данной сфере.

*Рекомендации общего характера:*

- Не изменяя базовых принципов, сформулированных в законодательстве в сфере биотехнологии и охраны окружающей среды, ввести дополнительные положения, конкретизировать декларативные нормы права.

- Разработать программу принятия правовых актов в области биотехнологии с учетом особенностей каждой затрагиваемой отрасли хозяйства, обеспечивая комплексный подход к устранению пробелов в правовом регулировании в данной сфере.

- Расширить действующее законодательство путем принятия федеральных законов, создавая правовую основу для всех основных направлений биотехнологии.

- Принять подзаконные нормативные правовые акты, конкретизирующие базовые положения федеральных законов путем установления четких, исполнимых и исчерпывающих требований к субъектам, осуществляющим деятельность в области биотехнологии. Ограничения могут быть предусмотрены исключительно с целью снижения рисков негативного воздействия на здоровье человека и окружающую среду, а также исходя из общих принципов этики.

- Во избежание возможных противоречий, а также с целью повышения эффективности реализации правовых норм в сфере биотехнологии желательно объединить

близкие по предмету регулирования ведомственные нормативные правовые акты и принять по каждой из групп соответствующий нормативный правовой акт на уровне Правительства РФ.

- Обеспечить реальный доступ граждан и организаций к информации, связанной с разработкой, производством и выпуском в окружающую среду продуктов генной инженерии.

*Конкретные предложения по совершенствованию нормативной правовой базы:*

- Как один из вариантов — разработать и принять ФЗ «Основы законодательства Российской Федерации о биотехнологии». Данный закон стал бы базовым для всех направлений в сфере биотехнологии. Во избежание громоздкости он должен будет носить в большей степени декларативный характер, устанавливать общие принципы в отношении осуществления деятельности в области биотехнологии и использования полученного в результате соответствующей деятельности продукта, а также определять задачи правового регулирования. Каждому направлению биотехнологии будет посвящен отдельный раздел. Принятие такого закона, однако, может создать и некоторые проблемы, связанные с тем, что биотехнология затрагивает множество отраслей хозяйства и, что еще более осложняет ситуацию, несколько отраслей права. Это повлечет необходимость постоянного внесения поправок.

- Предусмотреть в ФЗ «Об охране окружающей среды» стандарты и нормативы в связи с выпуском в окружающую среду ГМО. В частности, в статье 22 можно предусмотреть норматив допустимого количества генетически модифицированных растений, животных и микроорганизмов на единицу площади, веса или объема в зависимости от таксона ГМО и рассматриваемой среды обитания. В этом отношении наибольшую сложность будет представлять не введение конкретных показателей и предельно допустимых концентраций, а обеспечение проведения реального контроля над исполнением требований. Методы контроля должны быть четкими, информация по ним — доступной, а само исполнение — осуществимым.

- В статье 23, посвященной нормативам допустимых выбросов и сбросов веществ и микроорганизмов, можно предусмотреть пункт, касающийся генетически модифицированных микроорганизмов (ГММ), закрепляя принцип недопустимости соответствующих действий. В качестве исключения можно предусмотреть случаи непреднамеренного сброса ГММ, избежать присутствие которых в числе общей массы используемых микроорганизмов было технически невозможно и их

концентрация не превысила 0,1% от общего количества микроорганизмов. В любом случае конкретные нормативы могут устанавливаться в зависимости от конкретных свойств тех или иных микроорганизмов.

- Разработать и принять ФЗ «О порядке ввоза на территорию Российской Федерации и вывоза с территории Российской Федерации генетически модифицированных продуктов», а также ряд Технических Регламентов, регулирующих биотехнологическую промышленность.

- Разработать и принять ФЗ «О порядке выпуска ГМО в окружающую среду», используя в качестве основы для определения оснований допустимости такого выпуска требования, предъявляемые в одном из федеральных законов Швейцарии «О применении генной инженерии в сфере, не связанной с генной инженерией человека (О генной инженерии)» [9]. Что касается требований к самому порядку выдачи разрешения, состава прилагаемых заявителем документов, программы оценки рисков и перечня вопросов, касающихся технологии получения и свойств ГМО, можно воспользоваться Директивой Европейского Союза 2001/18ЕС в отношении преднамеренного выпуска ГМО в окружающую среду [7].

- Разработать и утвердить Положение о производстве и применении фитосанитарной и биоцидной продукции, устанавливая четкие и обоснованные требования по использованию микроорганизмов в ходе ее производства и опираясь на правовую базу Швейцарии в этой сфере: Ордонанс «О размещении на рынке и использовании биоцидной продукции» [10] и Ордонанс «О выпуске в обращение фитосанитарной продукции» [11].

- Установить ответственность за экологические правонарушения в связи с осуществлением деятельности в сфере биотехнологии, предусматривая составы правонарушений по всем ее направлениям, в особенности, в части использования ГМО. Санкции должны предусматриваться в зависимости от степени риска окружающей среде. В качестве основы для разработки можно использовать положения Закона Испании «Об использовании в замкнутых системах, намеренном выпуске и введении в коммерческий оборот генетически модифицированных организмов» [8]. В данном случае правовая база Швейцарии тоже может помочь при разработке составов правонарушений, но действующие санкции едва ли могут быть использованы, так как в основном предусматривают уголовную ответственность и наказание в виде лишения свободы.

- Проект ФЗ «О биомедицинских клеточных технологиях» должен быть принят как можно скорее, несмо-

тря на риск появления нежелательных и неоправданных барьеров, которые он создаст в отношении лиц, осуществляющих данный вид деятельности. Федеральный закон закроет пробел правового регулирования в этой области и даст возможность осуществлять соответствующую деятельность в правовом поле.

Принятие новых законов, а также введение поправок в текущее законодательство позволят России сделать серьезный шаг в сторону подписания базового международного акта в сфере биотехнологии — Картахенского протокола по биобезопасности.

Россия находится в благоприятной позиции, позволяющей развивать нормативную правовую базу для относительно нового направления — современной биотехнологии и использования ее результатов в различных направлениях хозяйства.

Основной задачей на данном этапе является не столько разработка принципиально новых правовых актов, сколько анализ уже разработанных за рубежом, действующих в течение определенного времени и успешно реализуемых на практике. Цель такого анализа состоит в формировании и совершенствовании национальной нормативной правовой базы в сфере биотехнологии в контексте экологической безопасности путем заимствования наиболее эффективных правовых норм различных зарубежных законодательств и сведения их в единую систему.

## Литература

1. Краснопольская И. Клетка в законе. Проект документа о применении стволовых клеток вызывает много споров // Российская газета — Федеральный выпуск, 11.02.2011, № 5405 (29).
2. Проект Федерального закона от 26 февраля 2011 г. «О биомедицинских клеточных технологиях» [Электронный ресурс] // [http://www.minzdravsoc.ru/docs/doc\\_projects/535/](http://www.minzdravsoc.ru/docs/doc_projects/535/).
3. Федеральный закон от 17 февраля 1995 г. № 16-ФЗ «О ратификации Конвенции о биологическом разнообразии» // СЗ РФ, от 20 февраля 1995 г., № 8, ст. 601.
4. Федеральный закон от 10.01.2002 N 7-ФЗ (ред. от 29.12.2010) «Об охране окружающей среды» // СЗ РФ, 14.01.2002, № 2, ст. 133.
5. Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity (Montreal, 29 January 2000) // United Nations. Treaty Series, 2000. — Vol. 2226. — P. 208.
6. Convention on Biological Diversity. Concluded at Rio de Janeiro on 5 June 1992 // United Nations. Treaty Series, 1993. — No 1760, 1-30619. — P. 143–382.
7. Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing

- Council Directive 90/220/EEC // Official Journal of the European Union, L 06, 17 April 2001. — P. 1–38.
8. Ley 9/2003, de 25 de abril, por la que se establece el regimen juridico de la utilizacion confinada, liberacion voluntaria y comercializacion de organismos modificados geneticamente. // Boletin Oficial del Estado, num. 100, 26 abril 2003. — P. 16214–16223.
9. Loi federale du 21 mars 2003 sur l'application du genie genetique au domaine non humain (Loi sur le genie genetique, LGG) L'Assemblee federale de la Confederation suisse // Recueil officiele du droit federal, 2003. — P. 4803–4834.
10. Ordonnance concernant la mise du 18 mai 2005 sur le marche et l'utilisation des produits biocides (Ordonnance sur les produits biocides, OPBio) (mod. 1<sup>er</sup> juin 2010) // Recueil officiele du droit federal, 2005. — P. 2821–2868.
11. Ordonnance du 12 mai 2010 sur la mise en circulation des produits phytosanitaires (Ordonnance sur les produits phytosanitaires, OPPh). Le Conseil federal suisse // Recueil officiele du droit federal, 2010. — P. 2331–2510.

## PROSPECTS FOR IMPROVING THE LEGAL REGULATION OF BIOTECHNOLOGY IN THE RUSSIAN FEDERATION

Ju.A. PETUSHKOVA

*Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

This review discusses current issues of legal regulation in the field of biotechnology in Russia. Emphasis is placed on a comparison of foreign and domestic legal norms. The unresolved issues are noted. Some suggestions for improving the regulatory framework are given.

*Keywords:* biotechnology, legal regulation, Russian Federation.

## МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ, ПРАВОВЫЕ И ЭТИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КРОВЕТВОРНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РОССИИ

Р.М. ХАИТОВ<sup>1</sup>, Н.Ю. ХАМАНЕВА<sup>2</sup>, Л.П. АЛЕКСЕЕВ<sup>\*</sup>, А.А. РАГИМОВ<sup>3</sup>,  
К.В. УТКИН<sup>1</sup>, М.Н. БОЛДЫРЕВА<sup>1</sup>, П.Л. АЛЕКСЕЕВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России,

<sup>2</sup> Институт государства и права РАН,

<sup>3</sup> ФГБУ «Российский Национальный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского» РАМН, Москва

Рассматриваются вопросы правового регулирования трансплантации кроветворных стволовых клеток в Российской Федерации. Обсуждается ряд дискуссионных пунктов в подготавливаемых нормативно-правовых актах.

*Ключевые слова:* кроветворные стволовые клетки, трансплантация, правовое регулирование.

Настоящий обзор подготовлен в связи с широко дискутируемой в профессиональном сообществе проблемой правового регулирования применения биомедицинских клеточных технологий, в том числе и проекта Федерального закона «Об обращении биомедицинских клеточных продуктов». В качестве основной темы выбрана трансплантация кроветворных стволовых клеток (КСК). Это направление служит демонстративным примером успешного использования клеточных технологий в клинике. Сейчас трансплантация КСК нашла широкое применение при лечении онкогематологических патологий различного генеза. Особенно значим вклад такой терапии в детскую онкогематологию. Трансплантация КСК на сегодняшний день в абсолютном большинстве развитых и развивающихся стран представляет собой доступный метод терапии, спасающий жизни тысячам людей, для которых их диагноз звучал как смертный приговор.

Следует отметить, что успехи в этом направлении были достигнуты существенно позже, чем в области трансплантации органов. Это было связано, в первую очередь, с тем, что трансплантация КСК (которую ранее было принято называть «трансплантацией костного мозга (КМ)») требует несравненно более высокого уровня тканевой совместимости между донором и реципиентом, по сравнению с органами пересадки. Так, если

подбор тканесовместимых пар донор-реципиент при трансплантации органов был достаточно эффективным уже в 1970–1980-х годах, когда количество типизируемых HLA-специфичностей не превышало 140, то возможность эффективного подбора КСК появилась лишь в 1990-х годах, когда благодаря переходу на молекулярно-генетические методы HLA-генотипирования, количество выявляемых HLA-специфичностей многократно возросло. К настоящему времени установлено более 5000 специфичностей (аллельных вариантов), значительную часть из которых необходимо учитывать при подборе тканесовместимого донора [6]. Что касается замены термина КМ на КСК, то это отнюдь не означает, что сама процедура трансплантации именно КМ, а не КСК, выделенных из периферической крови донора, уже не используется в современных условиях. Говоря о трансплантации КСК, имеют в виду, что именно кроветворные стволовые клетки являются действующим началом для восстановления кроветворения и иммунитета. При этом не имеет значения, из какой субстанции они выделены: костный мозг, периферическая или пуповинная кровь. Более того, несмотря на значительно большую доступность КСК, выделенных из периферической крови, по сравнению с КМ, последний вид трансплантации имеет определенное преимущество за счет трансплантации КСК вместе с микроокружением, имеющимся в КМ — это особенно важно при неродственных трансплантациях.

КСК, полученные от тканесовместимых неродственных доноров, — это главный перспективный вид трансплантатов для основной массы населения России, так же, как и коренного населения большинства стран Европы. Дело в том, что для указанных групп населе-

© 2012 г. Хаитов Р.М., Хаманева Н.Ю., Алексеев Л.П.,  
Рагимов А.А., Уткин К.В., Болдырева М.Н., Алексеева П.Л.

**\* Автор для переписки:**

Алексеев Леонид Петрович

ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России

Тел.: +7 (916) 613-21-08

E-mail: l.p.alexeev@mail.ru



ния внутрисемейный поиск тканесовместимых доноров малоперспективен. Это объясняется тем, что вследствие кодоминантного типа наследования HLA-генов, при котором дети наследуют строго по половине HLA-генотипа от каждого родителя, дети и родители практически всегда являются HLA-совместимыми только наполовину. Поэтому родители практически всегда исключаются из числа потенциальных доноров. Что касается братьев и сестер, то вероятность нахождения тканесовместимого донора из их числа составляет 25%. Таким образом, исходя из демографической ситуации как в России, так и в большей части стран Европы, нахождение тканесовместимого донора в типичных семьях из числа коренного населения,

имеющих, как правило, 1 или 2 детей, маловероятно. Иная ситуация наблюдается среди представителей некоторых этнических групп, проживающих в Европе, но не относящихся к коренному населению и отличающихся значительным количеством детей в семьях. Именно среди них выше вероятность нахождения родственного тканесовместимого донора КСК.

Целесообразно привести некоторые статистические данные о количестве трансплантаций, осуществленных в Европе в последнее время (табл. 1). Подобранные цифры свидетельствуют о достаточно высокой активности специалистов и социальной востребованности данного вида медицинской помощи.

Таблица 1

**Обзор статистических данных по пересадкам костного мозга/стволовых клеток в 605 центрах Европы (2009 г.)**

HLA-идентичные сиблинги			Неидентичные сиблинги			Неродственные		
Костный мозг	Периферическая кровь	Пуповинная кровь	Костный мозг	Периферическая кровь	Пуповинная кровь	Костный мозг	Периферическая кровь	Пуповинная кровь
1310	3483	45	99	436	4	932	2851	458
27%	72%	0,9%	18%	81%	0,7%	22%	67%	11%

Учитывая все вышесказанное, становится ясным, почему трансплантация неродственных КСК приобретает все большую актуальность для многих стран, включая Россию. Однако для широкого использования данного вида трансплантаций в течение длительного периода существовала другая проблема, связанная с крайне высоким уровнем полиморфизма системы генов HLA, при котором вероятность полной HLA-идентичности двух случайно взятых лиц в среднем равна 1 : 3000000.

Эта, казалось бы, неразрешимая проблема в настоящее время решена за счет создания международной неправительственной организации — Всемирной Ассоциации Доноров Костного Мозга (ВАДКМ), объединяющей более 7000000 неродственных доноров-добровольцев, которые готовы безвозмездно предоставить для трансплантации свои КСК любому нуждающемуся в них больному, вне зависимости от места его проживания. Всю организационную работу в этом направлении осуществляет такая организационная структура, как регистр ВАДКМ, взаимодействующий

с национальными регистрами государств, официально участвующих в процессе поиска и обмена тканесовместимыми КСК во всем мире. Это дает возможность находить тканесовместимые КСК для 80% неродственных реципиентов, проживающих в тех или иных странах, где выполняются трансплантации.

К сожалению, Россия является единственной из стран с развитым здравоохранением, где трансплантация КСК от неродственных доноров гражданам России осуществляется практически только за ее рубежом. Такая ситуация практически беспрецедентна для Европы, причем речь идет не только об экономически развитых странах как Германия, Франция, Великобритания и др., но и о бывших странах СЭВ и о ряде бывших союзных республик.

Разумеется, имеются и другие государства, помимо России, находящиеся в подобной ситуации. Однако, как правило, речь идет о странах, в которых или отсутствует развитая система здравоохранения или же не созданы условия для выполнения столь высокотехнологичных

медико-биологических мероприятий, как практическое HLA-генотипирование на необходимом уровне и проведение комплекса медицинских мероприятий по обеспечению клинической трансплантации КСК. Решение указанных проблем требует длительной подготовки квалифицированных кадров, специального высокотехнологичного оборудования и опыта работы в данной области.

Примечательно, что в России медико-биологические проблемы трансплантации КСК практически решены. Так, российские ученые-иммуногенетики, занимающиеся работами в области изучения генов тканевой совместимости уже около 25 лет, являются одними из лидеров в разработке методов HLA-генотипирования для подбора тканесовместимых пар донор-реципиент [4]. В различных регионах России коллективы специализированных научных центров и клиник имеют значительный опыт трансплантации КСК (в основном при аутологичных и родственных не полностью HLA-совместимых трансплантациях). Большинство данных центров располагает современным оснащением.

К основным проблемам, приведшим к отставанию России в области трансплантации КСК, относятся проблемы административно-правового и организационного характера, и без решения этих проблем развитие трансплантации КСК в нашей стране невозможно.

Главный организационный вопрос — это отсутствие в России национального регистра безвозмездных неродственных доноров-добровольцев КСК, соответствующего стандартам ВАДКМ. Дело в том, что, согласно стандартам ВАДКМ, Национальный регистр КСК (НР КСК) должен соответствовать следующим требованиям.

НР КСК должен быть некоммерческой организацией, имеющей основное государственное финансирование (в софинансировании могут принимать участие некоммерческие фонды). При этом ВАДКМ строго контролирует соблюдение НР КСК требований международного права (в первую очередь, добровольность, безвозмездность и анонимность) и стандартов, разработанных ВАДКМ и касающихся функции, обязанностей, структуры и всех видов деятельности НР КСК. Среди этих видов деятельности:

- НР КСК принадлежат функции координации всех остальных структур, вовлеченных в осуществление процессов, обеспечивающих подбор и пересадку тканесовместимых КСК.

- НР КСК должен обрабатывать запросы из учреждений, расположенных внутри страны, или пришедшие из зарубежных центров на КСК от неродственных доноров больным, включая пуповинную кровь. НР

КСК должен координировать деятельность трансплантационного центра и донорских служб в данной стране. Деятельность независимых регистров координирует НР КСК. Для участия в международном обмене в рамках ВАДКМ необходимо соответствующая аккредитация регистра.

- НР КСК должен брать на себя ответственность и разрабатывать процедуры всех медицинских донорских затрат, начиная с диспансерного тестирования обследования до забора, процедуру забора и все медицинские расходы после забора, которые напрямую связаны с жертвованием. Ни один донор не должен брать на себя финансовые обязательства за какую-либо часть диспансерного тестирования и/или забор стволовых клеток/ процесс поставки. НР КСК несет ответственность за все разумные затраты, понесенные донором.

- НР КСК должен предложить пособия по инвалидности и смерти всем донорам стволовых клеток. Данные пособия могут быть предоставлены посредством покрытия страховки.

- НР КСК должен поддерживать страховые обязательства.

- НР КСК должен иметь адекватные административные структуры и финансовые ресурсы, чтобы гарантировать оплату по всем счетам в должный срок.

- НР КСК представляет собой организацию, одной из основных обязанностей которой является защита интересов и прав донора-добровольца.

- НР КСК должен иметь адекватные административные структуры и финансовые ресурсы, чтобы гарантировать оплату по всем счетам в должный срок. НР КСК должен брать на себя ответственность и разрабатывать протоколы всех медицинских донорских затрат, начиная с диспансерного тестирования и обследования до забора трансплантата. А также обеспечивать процедуру забора и все медицинские расходы после забора, которые напрямую связаны с донорством КСК.

Для выполнения своих обязанностей НР КСК должен включать в себя целый ряд структур и служб: лабораторию иммуногенотипирования, службы подбора тканесовместимых пар «донор-реципиент», реализации обмена образцами КСК, правовую, экономическую и целый ряд других. На примере функционирующих НР КСК их штат, как правило, превышает 100 квалифицированных специалистов различного профиля. При этом для России, по-видимому, наиболее критичными представляются стандарты НР КСК, связанные с обеспечением прав (в первую очередь, материальной защиты) добровольных доноров.

Именно нерешенность проблемы защиты прав безвозмездных неродственных доноров-добровольцев служит ведущей причиной отставания России в данной области высокотехнологичной медицины.

Современные зарубежные, в том числе международные правовые акты, регулирующие клиническую трансплантацию, содержат статьи, обеспечивающие защиту прав этой группы доноров. Последнее позволило широко развить добровольное донорство КСК практически во всех странах мира, объединенных в ВАДКМ, что дает возможность подбирать тканесовместимые КСК 80% больных, нуждающихся в этом виде трансплантации.

Единственным препятствием для решения проблемы трансплантации КСК в России является отсутствие доноров-добровольцев КСК. Главная причина здесь — отсутствие в отечественных правовых актах, регулирующих трансплантацию, статей, защищающих права доноров-добровольцев КСК. Результат этого — резкое отставание России в лечении онкогематологических заболеваний. Эта группа занимает одно из первых мест в смертности среди детей и взрослых, страдающих теми или иными формами рака.

Помимо этого, именно трансплантация КСК неродственного происхождения в мировом здравоохранении занимает на сегодняшний день второе место, вслед за трансплантацией почки, в числе всех видов клинической трансплантации. Массовость данного вида клинической трансплантации за рубежом объясняется тем, что он сегодня является единственно эффективным способом лечения больных с различными формами рака крови у взрослых и детей, а также наиболее эффективной терапией лиц, подвергшихся радиационному облучению. Этот вид клинической трансплантации имеет тем большую значимость для практического здравоохранения, что с его использованием связаны перспективы лечения целого ряда неизлечимых до настоящего времени заболеваний. Необходимо отметить, что на сегодняшний день только данный вид трансплантации, основанный на использовании КСК, представляется легитимным для мирового здравоохранения, включая российское.

Не вызывает сомнения тот факт, что решение вышеуказанных проблем практического здравоохранения невозможно без совершенствования и модернизации российского законодательства, регламентирующего клинические трансплантации КСК. На рубеже XX—XXI веков модернизация аналогичных правовых актов происходила и в других странах мира, но особенно четко это обнаружилось при работе руководства этическими

и правовыми структурами Евросоюза при создании единого наднационального правового акта, регламентирующего клиническую трансплантацию в государствах ЕС. Таким актом стал имеющий законодательную силу принятый Парламентской Ассамблеей Совета Европы и одобренный Комитетом Министров Совета Европы в 2001 г. Протокол «О трансплантации органов и тканей человеческого происхождения» к Конвенции «О защите прав и достоинства человеческих существ в связи с использованием достижений биологии и медицины».

В данном правовом акте обеспечению прав живых доноров-добровольцев и, в первую очередь, доноров КСК отводится особое место. Последнее является абсолютно обоснованно по следующим соображениям. В отличие от трансплантации органов, где в качестве доноров могут выступать только генетические родственники и побудительным мотивом донорства является родственное отношение, при пересадке КСК от безвозмездных неродственных доноров-добровольцев побудительным мотивом донорства служит альтруизм. При этом донор и больной, как правило, не знакомы, не общаются друг с другом и чаще всего проживают в разных странах. В то же время донорство КСК не только имеет риск развития осложнений, но и требует определенных финансовых затрат, в том числе потерь рабочего времени и т.д. Компенсация указанных рисков и потерь предусмотрена в зарубежных (включая международные) правовых актах<sup>1</sup>.

К сожалению, в Законе Российской Федерации «О трансплантации органов и (или) тканей человека» от 1992 года и в его последующих редакциях [3] данные вопросы практически не рассматриваются и имеются лишь две статьи — 12 и 16, в которых речь идет об охране прав живых доноров-добровольцев. Однако эти статьи применимы только к родственным донорам и никоим образом не относятся к добровольным неродственным донорам КСК.

Аналогично и в Федеральном законе «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21 ноября 2011 года №323-ФЗ в Статье 47 «Донорство органов и тканей человека и их трансплантация (пересадка)» [4] речь идет о защите прав живых неродственных доноров-добровольцев, за исключением Пункта 13 «Не допускается принуждение к изъятию органов и тканей человека для трансплантации (пересадки)».

В Законе Российской Федерации «О трансплантации органов и (или) тканей человека» от 1992 года, как указывалось, имеется только две статьи, в которых речь идет о добровольных донорах. Это Статьи 12 и 16, однако реально эти статьи могут защищать лишь живых органических доноров.

Так, в Статье 12 этого акта «Права донора» говорится: «Донор, изъявивший согласие на пересадку своих органов и (или) тканей, вправе получать бесплатное лечение, в том числе медикаментозное, в учреждении здравоохранения в связи с проведенной операцией». Статья 16 «Ответственность учреждения здравоохранения» того же Закона гласит: «Если здоровью донора или реципиента причинен вред, связанный с нарушением условий и порядка изъятия органов и (или) тканей либо условий и порядка трансплантации, предусмотренных настоящим Законом, учреждение здравоохранения несет материальную ответственность перед указанными лицами в порядке, установленном законодательством Российской Федерации».

Статья 12 никоим образом не отражает прав доноров КСК. При этом следует обратить внимание на то, что имеющаяся в нем безликая формулировка «лечение в учреждениях здравоохранения» вообще не приемлема для защиты прав доноров-добровольцев, поскольку помощь им или наблюдение, как это предусмотрено зарубежными законодательными актами, должны оказываться в специализированных лечебных учреждениях, а не в поликлиниках.

Что касается Статьи 16 то, как следует из ее текста, объектом, несущим материальную ответственность перед донорами КСК, служат абстрактные «учреждения здравоохранения». Одним из таких требований ВАДКМ является создание государственной структуры — национального регистра кроветворных стволовых клеток (НР КСК), одна из основных обязанностей которого — обеспечение прав доноров КСК, включая законодательно закрепленное адекватное страховое возмещение, оплату пропущенных рабочих дней и т.д. В России потенциальные доноры-добровольцы КСК в настоящее время реально лишены этих прав. Личные материальные отношения между донором и реципиентом категорически запрещены, поскольку донорство КСК, согласно российскому законодательству, абсолютно безвозмездно, оплата донорства органов или тканей приравнивается к осуществлению купли и продажи органов и карается в соответствии с законодательством РФ. Аналогичные статьи, имеющиеся в законодательстве подавляющего большинства стран мира, также запрещают торговлю органами и тканями. Нарушение этого положения для участников международных программ по обмену тканесовместимыми трансплантатами КСК ведет к их исключению из этих программ. Последнее для большинства стран-участников этих программ фактически означает прекращение трансплантаций КСК.

Для решения проблемы отставания России в области клинической трансплантации КСК предлагается внести в текст Закона «О трансплантации органов и (или) тканей человека» РФ изменения и дополнения, позволяющие гармонизировать данный закон с аналогичными международными и правовыми актами, регулирующими клиническую трансплантацию в странах, имеющих развитую систему здравоохранения. При этом помимо введения в Закон статей, обеспечивающих законодательное обеспечение защиты неродственных доноров-добровольцев, целесообразно также ввести терминологические изменения по тексту Закона.

Так, целесообразно везде по тексту Закона заменить термин «костный мозг» на термин «кроветворные стволовые клетки — КСК» с дополнением «вне зависимости от их происхождения» (костный мозг, периферическая кровь, пуповина). Целесообразность замены обусловлена тем, что КСК являются действующим началом при трансплантации в целях восстановления кроветворения и функции иммунной системы не только при их выделении из костного мозга, но и из других вышеперечисленных источников, в том числе периферической крови и пуповины новорожденного. Термин «КСК» используется во всех современных правовых актах, регламентирующих клиническую трансплантацию. Помимо этого, отсутствие термина «КСК» в тексте Закона «О трансплантации органов и (или) тканей человека» может привести к правовой коллизии между данным Законом и Законом о крови Российской Федерации, поскольку с позиции последнего закона «КСК» в принципе могут быть квалифицированы как компоненты крови.

В Законе о трансплантации целесообразно предусмотреть статью или статьи, направленные на охрану здоровья доноров КСК. Основой такой статьи должно быть страховое покрытие возможных неблагоприятных последствий процедуры донорства КСК в целом. Также целесообразно введение в Закон положения о бесплатном медицинском мониторинге доноров КСК и при необходимости их лечения в специализированных медицинских учреждениях, а не в «учреждениях здравоохранения», как это прописано в существующем Законе, поскольку такая формулировка отсылает донора в поликлинику по месту жительства.

В Законе должны быть также предусмотрены положения, имеющиеся в большинстве национальных и международных правовых актах, регламентирующих клиническую трансплантацию КСК, а именно:

- Оплата времени, затраченного на процедуру донорства.

- Оплата проезда (в случае необходимости) до места расположения трансплантационного центра, где находится реципиент, для самого донора и сопровождающего лица и проживания.

Следует учесть, что и в международном, и в российском законодательствах отражен запрет на оплату донорства КСК, но допускаются социальные и медицинские льготы для доноров. Перечень последних может быть включен в подзаконные акты, разработанные Минздравсоцразвития России для данной группы доноров-добровольцев.

Отдельно следует рассмотреть вопрос об адекватном страховании здоровья донора на случай возникновения у него осложнений или заболеваний вследствие неблагоприятного воздействия на организм и, в первую очередь, иммунной системы вследствие воздействия препаратов, стимулирующих усиленный выход в кровь КСК. Результатом этого может явиться «истощение» общего количества (пула) КСК, результатом чего может стать преждевременное развитие иммунологической недостаточности, которое обычно развивается у человека в преклонном возрасте, когда резко возрастает риск развития онкологических и инфекционных заболеваний. Во всяком случае эта ситуация уже доказана на экспериментальных моделях животных различных видов. Поэтому в ближайшее десятилетие эта ситуация может стать серьезной проблемой для международного здравоохранения. Отсроченный характер данного неблагоприятного эффекта объясняется следующим. Широкое применение трансплантаций КСК, выделенных из периферической крови доноров, имеет всего лишь 10–15-летнюю историю, а допустимый возраст для донорства КСК не превышает 45 лет при оптимальном — 20–30 лет. Это и определяет отсроченный характер возникновения возможных неблагоприятных последствий донорства КСК и явилось также причиной того, что клинические испытания препаратов, стимулирующих выход КСК, не могли проводиться в полном объеме, поскольку это потребовало бы несколько десятилетий. Таким образом, само по себе использование КСК, выделенных из периферической крови доноров, в клинической трансплантации по существу может быть отнесено к клиническим испытаниям препаратов, стимулирующих выход КСК из периферической крови.

Учитывая все вышесказанное, есть основание для того, чтобы внести следующее предложение. Приравнять в правовом отношении доноров-добровольцев КСК к категории добровольных испытуемых лекарственных препаратов, защита прав которых определяется положениями Закона Российской Федерации «Об обращении

лекарственных средств» от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ [2]. Его Статья 44 «Обязательное страхование жизни, здоровья пациента, участвующего в клиническом исследовании лекарственного препарата для медицинского применения» говорит о конкретных выплатах добровольцам-испытуемым лекарственных препаратов, в зависимости от тяжести непредвиденных последствий их применения. При этом объектом обязательного страхования служит имущественный интерес пациента, связанный с причинением вреда его жизни или здоровью в результате проведения клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения. Согласно данной статье, объем страховых выплат зависит от тяжести последствий воздействия лекарственных препаратов на организм добровольных испытуемых (включая обратимое ухудшение состояния здоровья, инвалидность различных групп и смерти вследствие неблагоприятного воздействия лекарственного препарата).

При этом следует отметить, что, согласно данному законодательному акту (Статья 44), сами по себе сроки развития осложнений и заболеваний у испытуемого не имеют значения, то есть страховые случаи могут наступать как непосредственно в период воздействия препаратов, стимулирующих КСК, так и в отдаленные сроки.

Большое значение имеет также то, что в случае смерти лица, участвовавшего в клиническом исследовании лекарственного препарата, выгодоприобретателями по договору обязательного страхования в соответствии с гражданским законодательством становятся граждане, обладающие правом на возмещение вреда в случае смерти кормильца.

Учитывая все вышесказанное, использование Статьи 44 Закона Российской Федерации «Об обращении лекарственных средств» в качестве основы для формирования положений нового Закона о трансплантации Российской Федерации позволит законодательно решить основную проблему развития в России трансплантации КСК. Причем тот факт, что практически аналогичная статья уже содержится в другом российском законе, позволит внести данное дополнение в Закон о трансплантации в кратчайшие сроки.

Дополнительно в Закон РФ «О трансплантации органов и (или) тканей человека» или в подзаконные акты, разрабатываемые Минздравсоцразвития России, необходимо внести права на медицинские и социальные льготы, непосредственно связанные с проведением процесса донации (процедура выделения КСК из организма донора), как это отражено в национальных и международных правовых актах, регулирующих трансплантацию

КСК за рубежом [1]. Последние акты включают в себя положения статьи (ст. 44), обеспечивающие бесплатное для доноров медицинское обследование и наблюдение как в период до донации, так и после нее, оплату транспортных расходов (если они необходимы) и компенсацию за потерянные рабочие дни. Включение в соответствующие правовые акты указанных положений не представляют собой нарушение основного требования к международному законодательству о бесплатности донорства КСК, а, напротив, способствуют гармонизации отечественного законодательства с существующими международными и национальными правовыми актами, регулирующими трансплантацию КСК.

Также для осуществления подобной гармонизации необходимо внесение в Закон «О трансплантации органов и (или) тканей человека» положений о необходимости пропаганды безвозмездного добровольного неродственного донорства КСК. При этом целесообразно использовать адресную пропаганду среди групп населения с повышенным риском развития онкогематологических заболеваний, к которым относятся, в частности, группы лиц, занятых на производствах, предполагающих возможность радиоактивного облучения.

В настоящее время предпринимаются шаги в целях радикального решения рассматриваемой проблемы. Так, в частности, в 2011 году в Минздравсоцразвития России создана рабочая группа по рассмотрению вопроса о включении Российской Федерации в Международный регистр доноров костного мозга и разработки предложений по созданию Российского национального регистра доноров костного мозга, численностью не менее 5 тысяч доноров. На последнем заседании этой рабочей группы был вынесен вопрос о целесообразности организации в России Национального регистра КСК, отвечающего стандартам ВАДКМ. Одним из членов рабочей группы руководителем одного из крупнейших центров трансплантации КСК в РФ было выдвинуто предложение об организации Национального регистра КСК, предназначенного лишь для поддержания информационного обмена со штатом в 2–3 сотрудника, оснащенных ПК. Несмотря на возражения ряда членов рабочей группы, предложение было поддержано председателем — официальным представителем Минздравсоцразвития России. Таким образом, в настоящее время не существует реальных перспектив включения Российской Федерации в международный регистр. Принятие такого решения фактически означает отказ РФ от вступления в ВАДКМ в качестве полноправного члена этой организации. И ситуация остается на прежнем уровне — сотрудничество

отдельных трансплантационных центров с Региональным европейским регистром (Австрия).

Между тем роль трансплантаций КСК как необходимого компонента современной системы здравоохранения, за последние годы резко возрастает. Еще 10 лет назад этот метод высокотехнологичной терапии применялся исключительно для терапии онкогематологических заболеваний (т.н. рака крови), но в настоящее время сфера его использования расширилась и включает в себя использование данного вида терапии при лечении тяжелых вариантов аутоиммунных заболеваний, таких как сахарный диабет, системная красная волчанка и т.д. Более того, в самые последние годы появились реальные перспективы использования данного метода для лечения других форм рака и даже СПИДа. Во всяком случае, единственный достоверный случай излечения далеко зашедшей формы СПИД зарегистрирован именно при пересадке тканесовместимых КСК. Столь широкие терапевтические возможности данного метода объясняются следующим. При пересадке КСК в организм больного переносится новая, но идентичная его собственной иммунная система, которая заменяет его собственную. Эта новая иммунная система не несет в себе тех дефектов, которые послужили причиной развития смертельно опасных заболеваний, потребовавших проведения данного вида лечения.

В правовом аспекте, помимо обсуждавшихся выше проблем, существует еще одна, которая, на первый взгляд, носит чисто технический характер. В действительности без решения этой проблемы прогресс в области трансплантации КСК невозможен.

Данная проблема состоит в том, что в России до сих пор остается юридически не урегулированным вопрос пересылки и получения из-за рубежа образцов биоматериала для осуществления типирования по генам тканевой совместимости донора и реципиента, равно как и вопрос пересылки и получения из-за рубежа трансплантатов КСК от неродственных доноров-добровольцев. Таможенный кодекс Российской Федерации от 19.06.1995 г., а также Таможенный кодекс Таможенного союза в редакции Протокола от 16.04.2010 г. не содержат статей, согласно которым можно было бы пересылать и получать с таможенной территории вышеуказанные биоматериалы. Без такого рода обмена невозможно включение регистра граждан РФ, нуждающихся в трансплантации КСК, в ВАДКМ, то есть исключается сама возможность развития трансплантации КСК в России.

Что касается перспектив включения статей, регулирующих трансплантацию КСК, в Таможенный кодекс

Таможенного союза, к сожалению, главным препятствием является следующее. Основным объектом таможенного регулирования служит тот или иной ТОВАР. КСК не может рассматриваться как товар, поскольку по Законодательству РФ — Закон «О трансплантации органов и/или тканей» в ред. Федерального закона от 20.06.2000 N 91-ФЗ [3] предусмотрена уголовная ответственность за продажу органов и/или тканей. Зарубежное законодательство, как правило, также предусматривает уголовную ответственность, сопоставимую с торговлей людьми. На наш взгляд, единственной статьёй Таможенного кодекса Таможенного союза, в которую могут быть включены пункты, регламентирующие пересылку и получение из-за рубежа указанных видов биоматериала, является Статья 358. В ней говорится о перемещении через таможенную границу гробов с телами (останками) и урн с прахом, поскольку в этих случаях речь также идет о пересечении границ биоматериала, не имеющего товарной ценности.

Российские регистры, включенные в список ВАДКМ, не представили (за исключением ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздравсоцразвития России (г. Москва) в ВАДКМ запрошенной стандартной информации о том, что оценка доноров-добровольцев

и образцов КСК отвечает определенным минимальным критериям, предъявляемым ВАДКМ.

### Литература

1. Аналитические материалы по проекту «Анализ нормативно — правовой базы в области прав человека в контексте биомедицинских исследований и выработке рекомендаций по ее усовершенствованию», главный редактор Б. Г. Юдин, — М.: Издательство МГУ, 2007. — С. 1–301.
2. Закон Российской Федерации «Об обращении лекарственных средств» от 12 апреля 2010 г № 61-ФЗ.
3. Закон Российской Федерации «О трансплантации органов и (или) тканей человека» от 22 декабря 1992 года № 4180-1 (в ред. Федеральных законов от 20.06.2000 N 91-ФЗ, от 16.10.2006 N 160-ФЗ, от 09.02.2007 N 15-ФЗ, от 29.11.2007 N 279-ФЗ).
4. Федеральный закон «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21 ноября 2011 года № 323-ФЗ.
5. Хаитов Р.М. Физиология иммунной системы. — ВИНТИ РАН, 2005. — 375 с.
6. EFI Standards, version 5.6.1, EFI for Immunogenetics, Newsletter, December 2009, Issue 60, p. 13–17.

## MEDICAL AND BIOLOGICAL, LEGAL AND ETHICAL ISSUES HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN RUSSIA

R.M. KHAITOV<sup>1</sup>, N.Yu. KHAMANEVA<sup>2</sup>, L.P. ALEXEEV<sup>1</sup>, A.A. RAGIMOV<sup>3</sup>,  
K.V. UTKIN<sup>1</sup>, M.N. BOLDYREVA<sup>1</sup>, P.L. ALEXEEVA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Immunology,

<sup>2</sup> Institute of State and Law RAS,

<sup>3</sup> Acad. B.V. Petrovsky Russian National Center of Surgery RAMS, Moscow

The issues of legal regulation of hematopoietic stem cell transplantation in the Russian Federation. We discuss a number of discussion points prepared in regulatory enactments.

*Keywords:* hematopoietic stem cell transplantation, legal regulation.

# БИОТЕХНОЛОГИЯ КАК ОСНОВА ИННОВАЦИОННОЙ ЭКОНОМИКИ

Р.Г. ВАСИЛОВ\*

*НИИ биоэкономики Российского экономического университета им. Г.В. Плеханова, Москва*

В обзоре рассматриваются перспективы развития как интегральной основы инновационной экономики, в том числе построение экономики нового типа — биоэкономики. Материал обсуждается в контексте разработанной «Программы развития биотехнологии в Российской Федерации на 2011–2020 годы», которая призвана объединить усилия государства, общества и бизнеса с целью ускоренного развития биоиндустрии в стране.

Ключевые слова: биотехнология, биоэкономика, инновации.

## Введение

Биоэкономика — термин, появившийся сравнительно недавно в развитых странах мира для определения экономики, связанной с производством и переработкой биоресурсов, а также с масштабным применением биотехнологии. В настоящее время построение экономики нового типа — биоэкономики — становится приоритетным и стратегическим направлением государственного развития все большего числа стран. Объем инновационной биоэкономики (ИБ) в ЕС в 2010 году превысил 2 трлн. евро. По прогнозу ОЭСР, в 2030 г. на долю ИБ будет приходиться около 3% ВВП развитых стран и существенно больше — в развивающихся.

Проблемы, решаемые с помощью ИБ, это — обеспечение населения оптимальным питанием, качественным здравоохранением, предотвращение деградации среды обитания, восполнение убыли минеральных ресурсов для промышленности и энергетики за счет использования возобновляемых биоресурсов и т.д.

В соответствии с областью применения выделяют биоэкономику здоровья, биоэкономику сельского и лесного хозяйства, биоэкономику окружающей среды, биоэкономику промышленности и энергетики и др. Динамичное развитие ИБ связано со стремительным прогрессом биологических наук, биотехнологии и ряда смежных областей — инфо- и нанотехнологий и т.д.

## Состояние биоэкономики в мире и РФ

ОЭСР, Евросоюз, США, Китай, Индия и ряд других государств определили ИБ в качестве стратегического приоритета своего развития на ближайшие десятилетия. В этих странах созданы специальные программы поддержки ИБ, проводится целенаправленная государственная политика.

Годовой оборот мировой биоиндустрии — основы биоэкономики — в 2010 году составил более \$250 млрд. Крупнейшим биотехнологическим рынком в мире являются США, где создается половина мирового объема биотехнологической продукции. Второй по размеру рынок — это Азиатско-Тихоокеанский регион, где наиболее динамично развивают биотехнологии Китай, Япония, Корея, Индия, и др. Замыкает тройку лидеров ЕС.

Более половины мирового производства относится к продукции «красной» биотехнологии (биофармацевтические препараты и биомедицина), 12% — к «зеленой» (агропищевая продукция), остальное — биоматериалы промышленного назначения («белая» биотехнология).

Российская Федерация существенно отстает от ведущих стран по масштабам развития биотехнологии, в первую очередь, в развитии собственно промышленной биотехнологии. Вклад России в мировую биотехнологию ныне составляет десятые доли процента, хотя в 1989 г. СССР по общему объему производства биотехнологической продукции уступал только США.

В стране практически отсутствуют биотехнологические производства фармацевтических субстанций, ингредиентов для пищевой промышленности, сырьевых продуктов для химической промышленности, моторного биотоплива. Слабо внедряются современные биотехнологии в сельское хозяйство, горнодобывающую промышленность, энергетику.

© 2012 г. Василев Р.Г.

\* **Автор для переписки:**

Василев Раиф Гаянович

доктор биологических наук, профессор,

директор НИИ биоэкономики Российского экономического университета им. Г.В. Плеханова

Тел: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru



В условиях экономического кризиса биотехнология предоставляет исключительные возможности для развития реального сектора экономики и позволит внести вклад в решение таких проблем, как развитие депрессивных территорий, повышение занятости, переход на использование возобновляемого сырья и др.

Несмотря на имеющееся отставание в биотехнологии, Россия обладает всеми необходимыми предпосылками и потенциалом (наличие биоресурсов и энергоресурсов, пресной воды, научных школ, квалифицированных кадров и т.д.), чтобы преодолеть его и войти в число мировых лидеров в области биоиндустрии.

Главным препятствием на пути ускоренного развития биотехнологии в Российской Федерации является отсутствие в стране четко проработанной, долговременной государственной политики, ориентированной на приоритетную поддержку развития биотехнологии, должной координации и управления этой важнейшей сферой деятельности на общегосударственном уровне. Работа, проводимая в рамках отдельных ведомств, недостаточна в силу междисциплинарного и межотраслевого характера биотехнологии.

#### **Последние инициативы государства, бизнеса и общества**

Ныне биотехнология признана приоритетным направлением развития инновационной экономики и в Российской Федерации. Так, в Концепции долгосрочного социально-экономического развития Российской Федерации до 2020 года (утверждена распоряжением Правительства РФ 17 ноября 2008 г. N 1662-р) биотехнология наряду с информатизацией и нанотехнологиями включена в приоритеты высшего уровня.

В развитие указанной долгосрочной государственной стратегии в последнее время был принят ряд важных решений: утверждены Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года («ФАРМА-2020»), Стратегия развития медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и принята соответствующая ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

Отдельные аспекты теоретической и практической биотехнологии разрабатываются в рамках других государственных программ: ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы», ФЦП «Научные и педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы,

ФЦП «Развитие инфраструктуры наноиндустрии» (2008–2011), других государственных, федеральных и ведомственных программ (в их числе «Развитие здравоохранения» — Минздравсоцразвития России; «Государственная программа развития сельского хозяйства и регулирования рынков сельскохозяйственной продукции, сырья и продовольствия» — Минсельхоз России; «Воспроизводство и использование природных ресурсов» — Минприроды России; «Развитие рыбохозяйственного комплекса» — Росрыболовство и др.). Биотехнологическая тематика активно поддерживается РФФИ и научными программами государственных академий — РАН, РАМН, РАСХН. Прикладные и внедренческие проекты финансируются Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, РОСНАНО, РВК. Важным моментом является также решение Правительственной комиссии по высоким технологиям и инновациям от 03.08.2010 г. о формировании технологических платформ, в результате чего были подготовлены и утверждены 3 такие платформы в сфере биотехнологии: «Медицина будущего», «Биоиндустрия и Биоресурсы», «Биоэнергетика».

Все вышеупомянутые решения и мероприятия, осуществляемые на федеральном и региональном уровнях, привели к пониманию целесообразности формирования специальной государственной координационной программы по биотехнологии, которая определила бы политику Российской Федерации в данной области на средне- и долгосрочную перспективу. В настоящее время такая Программа разработана, она носит название «Программа развития биотехнологии в Российской Федерации на 2011–2020 годы (Программа «БИО-2020»)».

Целью данной Программы является создание в Российской Федерации высокотехнологичного сектора биоэкономики, основанного на широком внедрении достижений биотехнологии.

К основным задачам Программы относятся:

- создание инфраструктуры развития биотехнологии в России;
- формирование и реализация приоритетных инновационных и инвестиционных проектов в биотехнологии;
- широкомасштабное развертывание биоиндустрии в регионах страны по всем секторам биотехнологии;
- поддержка развития фундаментальной биотехнологии и физико-химической биологии;
- создание современных образовательных программ и системы подготовки кадров в области биотехнологии;

- сохранение и развитие биоресурсного потенциала Российской Федерации как основы биоиндустрии;
- решение актуальных социально-экономических, энергетических, экологических и других проблем страны методами и средствами биотехнологии;
- интеграция отечественной биотехнологии в мировую биоэкономику;
- совершенствование правовой, экономической, информационной и организационной базы для развития биотехнологии.

Реализация указанной Программы планируется на принципах государственно-частного партнерства с широким привлечением формирующихся технологических платформ, перспективных проектов бизнес-структур и активной деятельности научно-исследовательских учреждений и профильных ассоциаций специалистов.

В Программе будут реализовываться ключевые направления биотехнологии: медицинская биотехнология; сельскохозяйственная и пищевая биотехнология; промышленная биотехнология; биоэнергетика; природоохранная (экологическая) биотехнология; лесная биотехнология; морская биотехнология.

По медицинскому направлению к концу реализации Программы планируется выход на достаточно высокий процент импортозамещения биофармацевтических препаратов (до 80%) и развитие экспортного потенциала. Что касается биомедицины, то здесь намечается создание высокотехнологичных биомедицинских центров в базовых регионах страны.

Реализация мероприятий по направлению сельскохозяйственной и пищевой биотехнологии позволит решить вопросы создания высокоэффективного сельского хозяйства и обеспечения населения полноценным сбалансированным питанием. Речь идет о создании высокотехнологичной базы производства кормового и пищевого белка, создании сети производств глубокой переработки зерна и др. При этом планируется существенное повышение объемов производства биотехнологических сельскохозяйственных продуктов и рынка промышленной биотехнологии и биоэнергетики в соответствии с мировыми тенденциями.

Направление «Промышленная биотехнология» ставит главной целью создание крупнотоннажной биотехнологической промышленности в стране, обеспечение базовых секторов отечественной экономики сырьем и полупродуктами.

Направление «Биоэнергетика» считается также одним из приоритетов биоэкономики в РФ. Потенциал применения биогаза в РФ выглядит следующим образом:

замена 14–15% природного газа. В перспективе за счет биомассы в стране можно производить до 23% электрической энергии и 24% тепловой энергии. Биоэнергетика может сыграть ключевую роль в энергообеспечении регионов, села, муниципальных образований, малого и среднего бизнеса в регионах. В АПК России ежегодно скапливается более 770 млн. т сельскохозяйственных отходов, анаэробная конверсия которых позволит получать 66 млрд. куб. м биогаза или 33 млрд. л бензина/дизтоплива. Применение в энергетических целях 20 млн. га залежной пашни позволит получать 11,3 млн. т биоэтанола или 12 млн. т биодизеля, а также 22 млн. т кормовых добавок. Использование в РФ для энергетических целей более 500 млн. куб. м неделовой древесины, отходов лесосеки и деревообработки в ЛПК позволит производить более 11 млн. т биотоплива второго поколения.

Направление «Природоохранная (экологическая) биотехнология» основано на применении биотехнологии для защиты окружающей и производственной среды и среды обитания человека. Оно включает следующие комплексы мероприятий: «Биоремедиация»; «Экологически чистое жилье»; «Биологические коллекции и биоресурсные центры». Данный раздел Программы будет осуществляться во взаимодействии с исполнителями государственных программ «Охрана окружающей среды» и «Воспроизводство и использование природных ресурсов» (Минприроды России).

Направление «Лесная биотехнология» связано с воспроизводством и рациональным использованием лесных ресурсов. Биотехнологические методы позволяют ускорять рост и развитие деревьев, получать древесную биомассу заданного свойства, обеспечивать защиту от вредителей и болезней. Здесь запланированы два крупных перспективных проекта: «Трансгенные деревья»; «Плантации быстрорастущего леса».

В направлении «Морская биотехнология» акцент делается на современные промышленные технологии переработки гидробионтов и создание воспроизводственных комплексов на крупных естественных водоемах и водохранилищах РФ, в также развитие марикультур. Запланированы три проекта: «Создание сети аквабиоцентров»; «Глубокая переработка промысловых гидробионтов и продукции аквакультур»; «Специализированные корма для аквакультур». Этот раздел Программы будет выполняться в тесном контакте с программами, реализуемыми Росрыболовством: ФЦП «Повышение эффективности использования и развития ресурсного потенциала рыбохозяйственного комплекса в 2009–2017 гг.» и формируемой Государственной программой Российской

Федерации «Развитие рыбохозяйственного комплекса» (2012–2020 годы).

### **Что даст биоэкономика? Целевые показатели развития биотехнологии. Перспективные проекты**

Что даст реализация принимаемой Программы ускоренного развития биотехнологии в нашей стране? Ее целевые показатели выглядят следующим образом. К 2020 году намечается достижение таких уровней:

- продажа биотехнологической продукции за 2011–2020 гг. — 90 млрд. долларов;
- создание более 200 биотехнологических предприятий;
- формирование полноценной структуры биоэкономики;
- экспорт: 25% продукции;
- формирование новых рынков: биополимеры, био-разлагаемые материалы, биотопливо;
- 30% упаковки из биоматериалов;
- переработка 10% с/х отходов с помощью биотехнологии;
- переработка 30% отходов пищевых производств с помощью биотехнологии.

### **Региональный аспект**

Важным разделом намечаемой Программы развития биотехнологии в России служит широкая поддержка собственных региональных программ в субъектах РФ. Именно здесь биоэкономика может стать основой подъема экономики регионов, вовлечения максимального числа активного трудоспособного населения в хозяйственную и экономическую деятельность. Это по сути дела — экономическая демократия прямого действия, то есть естественная и демократическая сфера деятельности в области высоких технологий, направленная на повышение благополучия всего общества в целом и улучшения качества жизни отдельной личности.

На региональном уровне может достигаться максимальное использование биоресурсного потенциала — своеобразной конвертации географии в экономику и политику (биоэкономика и биополитика). Имеются расчеты, согласно которым оптимальное осуществление деятельности в рамках биоэкономических принципах ориентировочно приносит \$200/га прибыли.

На местах с большей эффективностью могут реализовываться мероприятия по сохранению биоразнообразия и экологического равновесия, в том числе с помощью создания новых современных биоресурсных центров и поддержания уже существующих биологических коллекций. Чтобы развивать биотехнологию и биоиндустрию, необходимо использовать биологические

коллекции по территории всей страны. Это — мощный инструмент развития отечественной биоэкономики и экономики в целом.

Всеми признается, что для осуществления перечисленных мероприятий требуется соответствующее законодательное обеспечение. В этом плане может оказать крайне полезным принятие федеральных законов об обороте генетических ресурсов и о государственной политике Российской Федерации в сфере биотехнологии.

Главное — в регионах благодаря политической воле руководителей может быть создан режим наибольшего благоприятствования, который будет способствовать развитию инициативы снизу, в том числе активизации малого и среднего предпринимательства, создания центров трансфера технологий, продвижения и сохранения квалифицированных кадров и т.д.

Сейчас уже реализуются региональные программы развития биотехнологии в Чувашской Республике и Республике Татарстан. На очереди другие регионы — Кировская, Пензенская, Калининградская области.

### **Приоритетные действия**

В настоящее время в развитие общих тенденций поддержки биотехнологии в нашей стране предпринимается ряд действий, направленных на интеграцию усилий государства, бизнеса и общества с целью достижения определенных позитивных результатов. Так, например, продолжает совершенствоваться и расширяться серия российских технологических платформ, повышается эффективность российского участия в европейской программе FP7, реализуются актуальные проекты в сфере биоиндустрии (производство лизина и др.), создаются бизнес-школы для подготовки кадров биотехнологов и т.д. Важным событием явилась организация НИИ биоэкономики при Российском экономическом университете им. Г.В. Плеханова, который призван консолидировать усилия разнопрофильных специалистов и способствовать интеграции в мировое сообщество экономических исследований в данной области. Укрепляется международное сотрудничество по биотехнологии в рамках СНГ и Конгресса «ЕвразияБио».

Резюмируя, следует еще раз подчеркнуть, что биотехнология и биоэкономика стали очевидной реальностью XXI века. Без них практически невозможен перевод экономики страны на инновационный путь развития. Эта истина уже давно осознана узкими специалистами и постепенно завоевывает признание в обществе в целом, в бизнес-структурах и, что особенно важно, среди представителей органов исполнительной и законодательной власти.

## **BIOTECHNOLOGY AS A BASIS FOR AN INNOVATIVE ECONOMY**

R.G. VASILOV

*Bioeconomy Institute, Plekhanov Russian University of Economics, Moscow*

This review discusses the prospects of development as an integral basis of the innovation economy, including the construction of the new economy – bioeconomy. The material discussed in the context of the developed «Biotechnology Development Programme in the Russian Federation for 2011–2020» which brings together government, business and society in order to accelerate the development of bioindustry in the country.

*Keywords:* biotechnology, bioeconomy, innovation.

## ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2012 ГОДА\*

## СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

**1797** — обнаружение Дженнером эффективности профилактической прививки от оспы — первая вакцинация осуществлена в мае 1796 г. (1797 год — год официального отклонения Лондонским Королевским обществом его рукописи «Исследование причин и действий коровьей оспы»).

**1877** — Роберт Кох разработал метод культивирования микроорганизмов в биологических жидкостях, предложил метод окрашивания бактерий анилиновыми красителями.

**1882** — открытие Кохом возбудителя туберкулеза.

**1882** — открытие фагоцитоза И.И. Мечниковым.

**1892** — открытие Д.И. Ивановским вируса табачной мозаики.

**1897** — открытие Эдуардом Бухнером бесклеточного брожения.

**1902** — Т. Бовери (Германия) и У. Саттон (США) независимо друг от друга сделали предположение, что гены расположены в хромосомах и что каждая яйцеклетка или сперматозоид содержит только по одной хромосоме каждого типа.

**1902** — присуждение Нобелевской премии по химии Эмилю Фишеру за исследования синтеза веществ с сахаридными и пуриновыми группами.

**1907** — начало изучения дрозофилы Т.Х. Морганом.

**1907** — получение Нобелевской премии по химии Э. Бухнером за биохимические исследования и открытие бесклеточного брожения.

**1912** — публикация книги Э.Б. Вильсона «Клетка и ее роль в наследственности и эволюции».

**1917** — впервые введен термин «биотехнология» (предложен венгерским инженером Карлом Эреки — Karl Ereky, 1865–1933).

**1917** — открытие бактериофагов канадским ученым Феликсом Д'Эреллем (Felix Huber D'Herelle, 1873–1949).

**1917** — основание Н.К. Кольцовым Института экспериментальной биологии (Москва).

**1922** — Т.Х. Морган создал карту хромосом дрозофилы.

**1927** — обнаружение Г. Меллером открытия радиационного мутагенеза: публикация статьи «Искусственная трансмутация генов».

**1927** — выступление Н.К. Кольцова на III Всероссийском съезде зоологов, анатомов и гистологов с идеей репликации наследственных молекул.

**1937** — обнаружение нуклеопротеидной (РНК) природы вируса табачной мозаики английским вирусологом Ф. Боуденом (Frederick Charles Bawden, 1908–1972).

**1947** — Барбара Мак-Клинтон сообщила об открытии подвижных генетических элементов у бактерий («транспозонов»).

**1947** — вручение половинной Нобелевской премии по физиологии и медицине супругам Карлу Ф. и Герти Т. Кори за открытие каталитического обмена гликогена; второй половины — Бернардо Альберто Усаю за открытие действия гормона передней доли гипофиза на обмен сахара.

**1952** — Алфред Херши и Марта Чейз показали генетическую роль ДНК в бактериофагах.

**1952** — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине Селмэну Ваксману за открытие стрептомицина.

**1952** — Дж. Ледерберг обнаружил перенос ДНК от одной бактерии к другой, опосредованный вирусом («трандукция»). Ввел термин «плазмида».

\* Материал подготовлен О.В. Воробьевой

**1957** — присуждение Нобелевской премии по химии Александру Тодду за работы по нуклеотидам и нуклеотидным коферментам.

**1957** — Ф. Крик и Дж. Гамов предложили концепцию центральной догмы молекулярной биологии — переноса генетической информации в цепи: ДНК — мРНК — белок.

**1957** — публикация статьи Мэтью Мезельсона и Франклина Стала о новом методе изучения макромолекул, с помощью которого ими было показано, что репликация ДНК имеет полуконсервативный характер (1958), то есть каждая дочерняя двойная спираль ДНК состоит из одной старой (матричной) цепи и одной вновь синтезированной цепи.

**1957** — публикация А.С. Спирина, А.Н. Белозерского, Н.В. Шугаевой, Н.В. Ванюшина «Изучение видовой специфичности нуклеиновых кислот у бактерий» в журнале «Биохимия» (Т. 22, С. 744–754) с предсказанием существования иРНК.

**1962** — присуждение Нобелевской премии по химии Дж.К. Кендрию вместе с М. Перуцем за исследование структуры глобулярных белков.

**1967** — выделение А. Корнбергом биологически активной ДНК (публикация: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, Vol. 58, P. 2321–2328).

**1967** — Мери Вейс и Ховард Грин предложили метод гибридизации соматических клеток.

**1967** — основание Института биологии развития АН СССР (ныне РАН), позднее получившего имя Н.К. Кольцова.

**1972** — П. Берг сконструировал и получил биологически активную гибридную плазмиду путем работы рестриктазой двух плазмид с последующей их сшивкой ДНК-лигазой. Таким образом была создана 1-я рекомбинантная молекула ДНК.

**1972** — Х.Г. Корана и др. синтезировали полноразмерный ген тРНК.

**1972** — присуждение Нобелевской премии по химии К. Анфинсену (одна половина) и У.Х. Стайну и

С. Муру (другая половина) за исследования рибонуклеазы.

**1972** — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине Дж. Эдельману и Родни Р. Портеру за установление химического строения антител.

**1972** — установлено, что структура ДНК шимпанзе и гориллы на 99% совпадает с человеческой.

**1977** — У. Гилберт и Ф. Сенгер независимо предложили быстрый метод определения последовательностей нуклеотидов в молекуле ДНК (в результате открылась возможность одному исследователю определять до 1000 нуклеотидов в неделю).

**1977** — Б. Риттер и Г. Гудман выделили ген инсулина крысы.

**1982** — разрешена к применению в Европе первая вакцина для животных, полученная по технологии рекомбинантных ДНК.

**1982** — разрешение FDA на выход на рынок генно-инженерного инсулина человека.

**1982** — создание биотехнологическим путем первого культурного растения — стойкого к антибиотику табака. Начало эры трансгенных растений.

**1987** — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине Судзуми Тонегаве за открытие генетических принципов генерации антител.

**1987** — первые полевые испытания генетически модифицированных сельскохозяйственных растений (помидор, устойчивый к вирусным заболеваниям).

**1987** — американский генетик М. Олсон из Вашингтонского университета сконструировал новый тип экспрессирующего вектора — «искусственные дрожжевые хромосомы» («yeast artificial chromosomes»), предназначенные для клонирования больших фрагментов ДНК.

**1987** — компания Genentech получила разрешение FDA на выпуск на рынок генно-инженерного тканевого активатора плазминогена.

**1987** — компания Calgene запатентовала модифицированный ген томата, подавляющий экспрессию антисмысловой полигалактуроазной РНК, что дает возможность отсрочить созревание плодов.

**1997** — первый опыт клонирования млекопитающего из дифференцированной соматической клетки («овечка «Долли») — Институт Рослина, Шотландия.

**2002** — расшифровка генома мыши.

**2002** — объявлено об успешном завершении секвенирования генома риса (полная расшифровка закончена в 2005 г.).

**2002** — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине С. Бреннеру, Дж.Э. Салстону и Х.Р. Хорвицу за открытие механизма апоптоза.

## ПЕРСОНАЛИИ

**190 лет со дня рождения Френсиса Гальтона**, выдающегося английского ученого-энциклопедиста.

**155 лет со дня рождения А.Н. Баха**, отечественного биохимика.

**140 лет со дня рождения Н.К. Кольцова**, российского биолога.

**135 лет со дня рождения Освальда Теодора Эйвери (1877–1955)**, американского микробиолога, показавшего в 1944 г. совместно с К. Мак-Леодом и М. Мак-Карти роль ДНК в передаче генетической информации.

**125 лет со дня рождения Н.И. Вавилова (25 ноября)**, отечественного генетика и селекционера.

**125 лет со дня рождения Эрвина Шредингера**, австрийского физика, лауреата Нобелевской премии (1933, совместно с П. Дираком).

**110 лет со дня рождения и 20 лет со дня смерти Барбары Мак-Клинтон (1902–1992)**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1983) за открытие подвижных элементов генома (спустя тридцать с лишним лет после этого открытия).

**110 лет со дня рождения Андре Львова (1902–1994)**, французского микробиолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1965, совместно с Ф. Жакобом и Ж. Моно).

**105 лет со дня рождения и 15 лет со дня смерти Александра Тодда (1907–1997)**, выдающегося английского химика, лауреата Нобелевской премии по химии (1957).

**100 лет со дня рождения Сальвадора Луриа (1912–1991)**, итало-американского биолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1969, совместно с М. Дельбрюком и А. Херши) за открытие цикла репродукции вирусов и развитие генетики бактерий и вирусов.

**100 лет со дня рождения и 10 лет со дня смерти Конрада Блоха (1912–2000)**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1964, совместно с Ф. Линеном) за открытия, касающиеся механизмов регуляции обмена холестерина и жирных кислот.

**100 лет со дня рождения Джорджа Паладе (1912–2008)**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1974, совместно с А. Клодом и К. де Дювом) за исследования структурной и функциональной организации клетки.

**95 лет со дня рождения Кристиана де Дюва**, бельгийского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1974, совместно с А. Клодом и Дж. Паладе) за исследования структурной и функциональной организации клетки.

**95 лет со дня рождения и 15 лет со дня смерти Джона К. Кендрию (1917–1997)**, английского биохимика, лауреата Нобелевской премии по химии (1962, совместно с М. Перуцом) за исследования структуры глобулярных белков.

**95 лет рождения со дня рождения Родни Роберта Портера (1917–1985)**, английского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1972, совместно с Дж. М. Эдельманом) за открытие химической структуры антител.

**90 лет со дня рождения Хара Гобинда Кораны**, (1922–2011) лауреата Нобелевской премии по физио-

логии и медицине (1968, совместно с Р.У. Холли и М.У. Ниренбергом) за расшифровку генетического кода и его роли в синтезе белков.

**90 лет со дня рождения Роберта У. Холли**, американского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1968, совместно с Х.Г. Кораной и М.У. Ниренбергом) за расшифровку генетического кода и его роли в синтезе белков.

**90 лет со дня рождения Стенли Коэна**, американского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1986, совместно с Р. Леви-Монтальчини) за открытия, имеющие значение для раскрытия механизмов регуляции роста клеток и органов. Один из пионеров (вместе с Гербертом Бойером) внедрения генной инженерии в практику.

**85 лет со дня рождения Маршалла У. Ниренберга (1927–2010)**, американского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1968, совместно с Х.Г. Кораной и Р.У. Холли) за расшифровку генетического кода и его роли в синтезе белков.

**85 лет со дня рождения и 10 лет со дня смерти Сезара Мильштейна (1927–2002)**, аргентинского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и биохимии — 1984 г., половинная премия вместе с Г. Келером за разработку техники получения гибридом; вторая половина была присуждена Нильсу К. Йерне за разработку теории идиотипической сети.

**85 лет со дня рождения Сидни Бреннера**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (2002, совместно с Р. Хорвицом и Дж. Салстоном) за открытия в области генетической регуляции развития органов и программированной гибели клеток (апоптоза).

**85 лет со дня рождения Джона Р. Вейна (1927–2004)**, английского фармаколога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1982, совместно с С. Бергстромом и Б. Самуэльсоном) за открытия, касающиеся простагландинов и родственных биологически активных веществ.

**80 лет со дня рождения Уолтера Гилберта**, американского молекулярного биолога, лауреата Нобелев-

ской премии — 1980 г., половинная премия вместе с Ф. Сенгером за вклад в определение последовательности оснований в нуклеиновых кислотах; вторая половина была присуждена Полу Бергу за фундаментальные исследования в области биохимии нуклеиновых кислот, в особенности, рекомбинантных ДНК.

**70 лет со дня рождения Стенли Б. Прузинера**, американского невролога и биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1997) за открытие прионов как нового биологического принципа инфекции.

**70 лет со дня рождения Джона Салстона**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (2002, совместно с Р. Хорвицом и С. Бреннером) за открытия в области генетической регуляции развития органов и программированной гибели клеток (апоптоза).

**65 лет со дня рождения Роберта Хорвица**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (2002, совместно с С. Бреннером и Дж. Салстоном) за открытия в области генетической регуляции развития органов и программированной гибели клеток (апоптоза).

**95 лет со дня смерти Эдуарда Бухнера (1860–1917)**.

**55 лет со дня смерти Герти Т. Кори**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине — 1947, половинная премия вместе с супругом Карлом Ф. Кори за открытие каталитического обмена гликогена; вторая половина присуждена Бернардо Альберто Усаю за открытие действия гормона передней доли гипофиза на обмен сахара.

**45 лет со дня смерти Г. Меллера**, выдающегося генетика, лауреата Нобелевской премии (1946).

**40 лет со дня смерти А.Н. Белозерского**.

**40 лет со дня смерти Эдуарда К. Кендалла (1886–1972)**, английского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1950, совместно с Ф.Ш. Хенчем и Т. Рейхштейном) за открытия, касающиеся гормонов коры надпочечников, их структуры и биологических эффектов.



**35 лет со дня смерти английского физиолога Арчибалда В. Хилла (1886–1977)**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине — 1922, половина премии за открытие теплообразования в мышцах; вторая половина была вручена вручена Отто Мейергофу за открытие законов регуляции поглощения кислорода мышцей и образования в ней молочной кислоты.

**30 лет со дня смерти шведского биохимика Хуго Теорелля (1903–1982)**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1955 года за открытия, касающиеся природы и механизма действия окислительных ферментов.

**25 лет со дня смерти американского биохимика Джона Х. Нортропа (1891–1987)**, лауреата Нобелевской премии по химии — 1946, вместе с У.М. Стенли за получение в чистом виде ферментов и белковых

вирусов; вторая половина была присуждена Дж.Б. Самнеру за открытие свойства кристаллизации ферментов.

**25 лет со дня смерти английского биолога Питера Брайана Медавара (1915–1987)**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1960, совместно с М. Бернетом) за исследования приобретенной иммунологической толерантности.

**15 лет со дня смерти Алфреда Херши (1908–1997)**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1969, совместно с М. Дельбрюком и С. Луриа) за открытие цикла репродукции вирусов и развитие генетики бактерий и вирусов.

**5 лет со дня смерти Артура Корнберга**, известного американского молекулярного биолога.

## ПРЕДСТОЯЩИЕ МЕРОПРИЯТИЯ 2012 ГОДА

### КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ, КОНКУРСЫ

#### Международная молодежная конференция «Биология — наука XXI века» (Москва, 24 мая 2012 г.)\*

24 мая 2012 года в Российском экономическом университете им. Г.В. Плеханова (Москва, Стремянный переулок, 36) состоится Международная молодежная конференция «Биология — наука XXI века». Конференцию проводят НИИ биоэкономики РЭУ им. Г.В. Плеханова и Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова при поддержке Министерства образования и науки РФ и Комитета по науке и наукоемким технологиям Государственной Думы ФС РФ.

Развитие общества в наступившем тысячелетии возможно на основе инновационного ресурса, который обеспечивается опережающим ростом фундаментальных и прикладных научных исследований. Современная модель развития науки характеризуется междисциплинарностью и интеграцией различных научных направлений, таких как биология, информатика и др.

Биология относится к обширной сфере «наук о жизни», которые определяют основные приоритеты в развитии не только естественных наук, но и, получив прикладное звучание в виде новейших технологий, материалов и продуктов, формируют актуальные тренды практически во всех сферах экономики: промышленности, энергетике, сельском хозяйстве, здравоохранении, социальной сфере, экологии и др. Такие понятия, как «биоиндустрия», «биомедицина», «биоинформатика», «биоэкономика», становятся очевидными реалиями нашей жизни.

Изменившаяся парадигма развития науки и общества нуждается в подготовке специалистов нового типа и создании соответствующей научной и интеллектуальной среды. В данном контексте системообразующим, объединяющим фактором может стать экономика. Поэтому Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова активно поддерживает формирующееся научно-практическое направление — биоэкономику. С этой целью в структуре университета был учрежден Институт биоэкономики, одним из первых мероприятий которого является организация настоящей конференции.

Цель конференции — рассмотрение современного состояния биологии и биотехнологии, обсуждение приоритетных научных направлений, представление актуальных проектов, обмен информацией и т.д. Особое внимание уделяется привлечению к участию в конференции молодых специалистов. С докладами на конференции выступят известные ученые в области биологии и биотехнологии.

Основные направления конференции:

- фундаментальная биология и биотехнология;
- биомедицина, биофармацевтика;
- биология растений, агробиотехнология, экобиология;
- прикладная микробиология, биоиндустрия, биоэнергетика;
- биоэкономика.

Участники конференции: молодые ученые и специалисты, работающие в различных областях биологии и биотехнологии, студенты, преподаватели, представители бизнес-структур, научных изданий и СМИ. Запланировано как очное, так и заочное участие с публикацией тезисов. Количество тезисов от одного участника не ограничено. Благодаря финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ участие в конференции (включая публикацию тезисов) бесплатно.

Общее число участников планируется более 500 человек. Допускается заочное участие в конференции (публикация тезисов). Оргкомитет оставляет за собой право отбора тезисов для включения в сборник материалов. Для участия в конференции необходимо заполнить заявку-регистрационную форму (регистрационная форма участника конференции — на сайте [www.biorosinfo.ru](http://www.biorosinfo.ru)).

Тезисы выступления должны быть направлены в электронном виде. Срок подачи заявок на участие и тезисов выступлений — до 20 мая 2012 г. Уведомление о включении в число участников конференции будет направлено оргкомитетом в течение 3 дней после поступления заявки.

Контакты: Тел.: +7 (499) 237-95-03 Карнаух Инесса Станиславовна, Федотова Елена Владимировна. E-mail: [mnk.biology21@yandex.ru](mailto:mnk.biology21@yandex.ru); +7 (495) 648-09-13 Гаева Татьяна Николаевна. E-mail: [obr@biorosinfo.ru](mailto:obr@biorosinfo.ru), [www.biorosinfo.ru](http://www.biorosinfo.ru).

\* Материал представлен Т.Н. Гаевой

### Круглый стол

#### «О совершенствовании законодательного обеспечения развития клеточных биомедицинских технологий в Российской Федерации» (Москва, 26 апреля 2012 г.)

26 апреля 2012 г. в Государственной Думе ФС РФ состоится круглый стол «О совершенствовании законодательного обеспечения развития клеточных биомедицинских технологий в Российской Федерации». Организатор Круглого стола: Комитет ГД ФС РФ по науке и наукоемким технологиям с участием Комитета ГД по охране здоровья. Цель Круглого стола — обсуждение правового регулирования деятельности, связанной с биомедицинскими клеточными технологиями. Участники Круглого стола: в работе примут участие депутаты ГД РФ, представители учреждений здравоохранения, НИИ, вузов, крупных медицинских центров, специалисты и эксперты в области клеточных технологий и биомедицины. К Круглому столу приурочено проведение выставки «Инновационные биомедицинские технологии в России» в Государственной Думе ФС РФ (23–27 апреля 2012 г.). В экспозиции, призванной отразить современное состояние российских биомедицинских технологий, примут участие ведущие научные центры, биотехнологические компании, объединения и ассоциации биотехнологии, биомедицины и биофармацевтики. Будут представлены следующие основные направления биомедицинских исследований: клеточные биомедицинские технологии, геномные исследования, биофармацевтические технологии, современные методы лабораторной диагностики и др.

Общество биотехнологов России принимает участие в организации Круглого стола. *Контакты:* +7 (495) 648-0913 E-mail: obr@biorosinfo.ru, www.biorosinfo.ru

#### Международные конкурсы ERA-NET по направлению «Индустриальная биотехнология»\*

В 2011 году в России стартовали пилотные конкурсы европейско-российских научно-технических проектов по схеме ERA-NET. Аббревиатура ERA расшифровывается как European Research Area — «Европейское исследовательское пространство». Схема ERA-NET является инновационным компонентом, предлагаемым

в 7-й Рамочной программе Европейского Союза дополнительно к основному механизму финансирования проектов, для координации национальных исследовательских программ. Участниками проекта являются представители национальных министерств и финансирующих агентств. Цель таких проектов состоит в том, чтобы объединить ресурсы исследований отдельных стран Европейского Союза и таким образом максимально усилить их. Проекты ERA-NET не предполагают прямого финансирования исследований, а предлагают различные меры для межправительственной координации существующих или новых программ финансирования.

Конкурс, ориентированный прежде на страны-члены ЕС, теперь распространился и на Россию. Конкурсы ERA-NET объявлены в дополнение к 7-й Рамочной программе ЕС. Этот механизм открывает новые возможности для сотрудничества. Как и в рамочных программах, Россия участвует в нем в качестве «третьей страны». К таким странам, находящимся вне пространства ЕС, относятся также США, Китай, Индия. Участниками проекта должны быть как минимум три научные команды. В конкурсах ERA-NET финансовые потоки не пересекают границу. Каждая сторона финансирует местные организации и выбирает, на что тратить деньги.

Сети европейских финансирующих организаций были созданы в период действия Шестой рамочной программы научно-технологического развития ЕС (6РП) для координации деятельности европейских национальных и региональных научных программ. Европейская комиссия профинансировала более 70 проектов ERA-NET, которые охватывают различные научные дисциплины — от исследований в области энергетики, сельского хозяйства и окружающей среды, промышленных технологий до астрофизики и социальных наук. Кроме того, ряд проектов посвящен горизонтальной тематике, например, международному сотрудничеству, малым и средним предприятиям и т.д. Координация в рамках проектов ERA-NET должна способствовать взаимодополняемости программ Сообщества и программ стран-членов ЕС, расширять организационное двустороннее и многостороннее сотрудничество между программами стран-членов ЕС и между программами стран-членов ЕС и третьих стран.

В 2011 году в России была запущена пилотная инициатива в рамках проекта 7-й Рамочной программы ЕС «ERA-NET Rus» (Включение Российской Федерации в Европейское исследовательское пространство: координация научно-исследовательских программ стран-

\* Материал представлен И.В. Шаровой

членов ЕС и ассоциированных стран Седьмой рамочной программы ЕС с Россией).

Были объявлены многосторонние конкурсы на проведение совместных европейско-российских проектов в области проектов в научно-технической сфере и прикладных исследований, с обязательным участием российской организации.

С российской стороны финансирующими организациями в конкурсе выступали: Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, РФФИ, РГНФ и РАН. С европейской стороны — министерства и фонды Германии, Греции, Испания, Норвегии, Польши, Турции, Финляндии, Франции, Швейцарии и Эстонии.

ERA-NET по направлению Индустриальная Биотехнология (ERA-IB). В продолжение развития данного механизма международного сотрудничества Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере вошел в состав консорциума тематического ERA NET по направлению «Индустриальная биотехнология» (акроним проекта — ERA IB).

Основной целью данной инициативы является выработка стратегии межнациональных исследовательских программ и организация сети между научными исследованиями, выполняемыми в различных странах в области индустриальной биотехнологии, их координация и развитие совместных подходов, приводящих к увеличению их эффективности.

Ключевая миссия проекта состоит в том, чтобы способствовать развитию биоэкономики, основанной на знаниях, уменьшать фрагментацию научных исследований в области промышленной биотехнологии, объединить ресурсы различных стран, оптимизировать механизмы финансирования и способствовать обмену знаниями между различными странами.

Консорциум проекта ERA IB-2 включает в себя финансирующие организации различных стран:

- Департамент по инновациям в науке и технике (Agentschap voor Innovatie door Wetenschap en Technologie, IWT), Бельгия.
- Научно-инновационный совет (Forskings- og Innovationsstyrelsen - DASTI), Дания.
- Агентство по вопросам окружающей среды и энергоресурсам Франции (ADEME), Франция.
- Агентство по возобновляемым ресурсам (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe, FNR), Германия.
- Федеральное министерство образования и науки Германии (Bundesministerium fuer Bildung und Forschung, BMBF), Германия.

- Министерство окружающей среды и сельского хозяйства Саксонии (Saechsisches Staatsministerium fuer Umwelt und Landwirtschaft, SMUL/Freistaat Sachsen), Германия.

- Министерство сельского хозяйства и развития сельских районов Израиля.

- Научный совет (Norges forskningsrad, RCN), Норвегия.

- Национальный центр исследований и разработок (NCBiR), Польша.

- Федеральное управление по высшему образованию, научным исследованиям, разработкам и финансированию инноваций (UEFISCDI), Румыния.

- Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises, FASIE), Россия.

- Министерство науки и инноваций (MICINN), Испания.

- Государственное управление технологической стратегией Великобритании (Technology Strategy Board, TSB), Великобритания.

- Фонд науки и технологии Министерства образования и науки Португалии (Fundacao para a Ciencia e a Tecnologia, FCT), Португалия.

- Совет по научным-техническим исследованиям Турции, (Turkiye Bilimsel ve Teknolojik Arastirma Kurumu, TUBITAK), Турция.

Участие России в данных конкурсах будет осуществляться через Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, который планирует в 2012 г. объявление совместных международных многосторонних конкурсов по направлению «Индустриальная биотехнология» в рамках проекта 7-й Рамочной программы ЕС «ERA IB-2».

Финансированию подлежат инновационные НИ-ОКР и прикладные исследовательские проекты в области промышленных биотехнологий по следующим тематикам:

- Ферменты и ферментные комплексы с улучшенными свойствами для создания новых или более эффективных биопроцессов (Improved enzyme systems for new and more efficient bioprocesses).
- Метаболический инжиниринг и системный биологический подход для получения новых микроорганизмов с улучшенными свойствами (Improvement of microorganisms by metabolic engineering and synthetic and systems biology approaches).
- Инновационные и высокотехнологичные продукты глубокой переработки сырья на основе биотехнологий (Innovative down-stream processing).

• Инновационные ферментационные и биокаталитические процессы получения базовых химических компонентов, биомономеров, олигомеров и полимеров (Innovative fermentation and bio-catalytic processes, e.g. for platform chemicals, including bio-monomers, oligomers and polymers).

• Биотехнологические процессы конверсии (включая процессы разделения) биомассы, отходов ее переработки, а также других возобновляемых источников углерода в продукцию с высокой добавленной стоимостью (Biological processing (including separation and conversion) of biomass, including from side streams, and other renewable carbon sources into value added products).

• Продукция с высокой добавленной стоимостью на основе растительных и животных клеточных культур (New valuable products by plant and animal cell cultures).

Для подготовки проектной заявки на этот конкурс формируется международный консорциум, состоящий из 3–8 организаций из разных стран, финансирующих данный конкурс. Срок подачи заявок: первая стадия — до 30 апреля 2012 г., вторая — до 31 июля 2012 г.

Заявки подаются координатором проекта от имени всего консорциума на английском языке. Форму предварительной заявки можно скачать на сайте Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере.

Отбор проектов будет осуществляться на основе международной экспертной оценки и совместного принятия решений. Финансирование отобранных проектов будет производиться по схеме, при которой каждая сторона-участница будет финансировать в рамках поддерживаемых совместных проектов только коллективы ее страны.

Таким образом, российские организации получат прямой доступ к участию в международных консорциумах по ключевым направлениям индустриальной биотехнологии. Участие России в новых конкурсах ERA IB — еще один шаг к укреплению научно-технологического сотрудничества Евросоюза и России в области биотехнологии, дополнительная возможность возникновения новых перспективных научных и инновационных направлений и творческих коллективов.

#### Литература:

1. ERA.Net RUS. Сайт проекта 7 рамочной программы ЕС «Включение Российской Федерации в Европейское исследовательское пространство: координация научно-исследовательских программ стран-членов ЕС и ассоциированных стран Седьмой рамочной программы ЕС с Россией» [Эл.

ресурс]. Режим доступа <http://www.eranet-rus.eu/>, свободный.

2. ERA-NET Scheme. Сайт 7 рамочной программы ЕС [Эл.ресурс]. Режим доступа <http://cordis.europa.eu/coordination/era-net.htm>, свободный.
3. Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере [Эл. ресурс]. Режим доступа <http://fasie.ru/>, свободный.
4. ERA IB. Сайт проекта 7 рамочной программы ЕС «ERA-NET «Towards an ERA in Industrial Biotechnology» [Эл. ресурс]. Режим доступа [www.era-ib.net](http://www.era-ib.net), свободный.

*Контакты:* Шарова Ирина Валерьевна, кандидат биологических наук, заместитель руководителя Российского национального Контактного центра «Биотехнология» 7-й Рамочной программы ЕС, руководитель отдела международных проектов, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН. Тел. +7 (495) 954-44-74; e-mail: [sharova@inbi.ras.ru](mailto:sharova@inbi.ras.ru). Гос. контракт № 12.741.11.01012.

**17–19 апреля 2012 года** в Москве, в Центральном выставочном комплексе «Экспоцентр» состоится 13-й Международный форум «Высокие технологии XXI века» в рамках нового крупномасштабного проекта «Россия инновационная — 2012» в соответствии с рекомендацией Правительства Российской Федерации. Организаторы: Институт экономики и комплексных проблем связи (ОАО «ЭККОС»); ООО «ЭКСПО-ЭККОС»; Российский фонд развития высоких технологий; Московская торгово-промышленная палата; Московская ассоциация предпринимателей; ЗАО «Экспоцентр»; при участии Фонда «Сколково»; при поддержке Министерства промышленности и торговли Российской Федерации, Правительства Москвы; под патронатом Торгово-промышленной палаты Российской Федерации. *Контакты:* ООО «ЭКСПО-ЭККОС», 117209 Москва, ул. Зюзинская, 6, кор. 2; Тел.: +7 (495) 332-35-95, 332-36-56, Факс: +7 (495) 332-36-84, E-mail: [www.expoecos.com](http://www.expoecos.com).

**31 мая — 1 июня 2012 г.** в Москве, в Президиуме Российской академии наук (Ленинский проспект 32 А) состоится VII Международный симпозиум «Россия-ЕС: сотрудничество в области биотехнологии, сельского, лесного, рыбного хозяйства и пищи в 7 Рамочной Программе». Цель симпозиума — обсуждение ключевых вопросов организации и перспектив научно-

---

технического сотрудничества России и Евросоюза в 7-й Рамочной программе по основным направлениям деятельности российской технологической платформы «БиоТех2030»:

- Промышленные биотехнологии.
- Пищевые биотехнологии.
- Лесное хозяйство.
- Агробиотехнологии.
- Аквабиотехнологии.

В симпозиуме предполагается участие представителей Европейской Комиссии, ведущих российских и европейских экспертов, руководителей крупных между-

народных научно-исследовательских консорциумов, организаторов российских и европейских технологических платформ. В рамках симпозиума 30 мая будет организован информационный день, посвященный участию в 7-й Рамочной программе ЕС. Дополнительная информация о симпозиуме: <http://www.fp7-bio.com>.

**18–21 июня 2012 года** в Бостоне (США) состоится конгресс биотехнологов «BIO 2012 International Convention». *Контакты:* <http://www.convention.bio.org>.

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 рубрикаций, со списком литературы, резюме на русском и английском языках; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде в формате TIF или JPEG. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале — литература на русском языке, затем — на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми

---

для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные установки (Index Medicus и др.).

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



Подписано к печати 30.03.12  
Формат 60/90<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага офсетная № 1.  
Печать офсетная. Гарнитура Академия.  
Печ. л. 5,0. Тираж 1000 экз.



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

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

Главными целями деятельности ОБР являются:

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

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

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

ОБР имеет отделения в 57 регионах России и объединяет свыше 3000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

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

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

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

*Контакты: Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33*

*Тел.: +7 (495) 648-09-13*

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