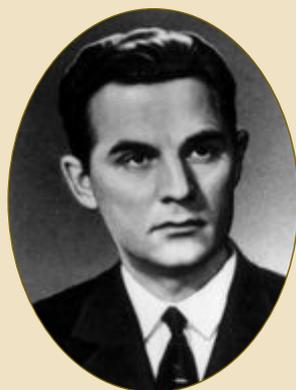


· БЕЛОЗЕРСКИЙ · ТОДД · СЕНГЕР · ОЧОА ·

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

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

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



Т. 8, № 3
2012

· СМИТ · ГИЛБЕРТ · БЕРГ · ЭНГЕЛЬГАРТ ·

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Васильов

Редакционная коллегия

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

Редакционный совет

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

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

Зав. редакцией О.В. Воробьева

Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13, 662-95-91

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

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем»

Адрес: 127581 Москва, Керамический проезд, 53, кор. 1

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@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. Васильев* 4

Оригинальные статьи

Получение эмбриональных стволовых клеток мышцы с индуцибельной экспрессией фактора роста нервов человека.

С.А. Антонов, Е.С. Мануилова, О.В. Долотов, А.Г. Кобылянский, С.В. Костров, Д.Р. Сафина, Н.В. Хайдарова, И.А. Гривенников 5

Влияние липополисахарида *Azospirillum brasiliense* Sp245 на морфогенетический потенциал каллусных клеток пшеницы *in vitro*.

О.В. Ткаченко, Н.В. Евсеева, Ю.В. Лобачев, Л.Ю. Матора, В.В. Дмитриенко, Г.Л. Бурьгин, С.Ю. Щеголев 13

Генетическое штрих-кодирование как подход к идентификации личности на примере популяции русских Республики Башкортостан.

Р.Р. Гарафутдинов, О.В. Чубукова, А.Р. Сахабутдинова, В.А. Вахитов, А.В. Чемерис 19

Исследование содержания биологически активных веществ в культуральной жидкости бактерии *Pseudomonas aureofaciens* при хранении.

Ю.А. Бурова, С.А. Ибрагимова, В.В. Ревин 26

Краткие сообщения

Использование пищевых добавок на основе вьетнамского сырья в производстве рыбных колбас.

Фам Бик Ха, О.В. Бредихина 31

Обзоры

Как исключить появление ложно-положительных результатов при проведении полимеразной цепной реакции?

А.В. Чемерис, Э.Г. Магданов, Р.Р. Гарафутдинов, В.А. Вахитов 34

О Комплексной программе развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года («БИО-2020»).

Р.Г. Васильев, В.И. Трубников 46

Проблемы и современное состояние трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в Российской Федерации.

Б.В. Афанасьев 53

Опыт Медицинского радиологического научного центра Минздрава России в области биомедицинских клеточных технологий и предложения по нормативно-правовому регулированию таких работ и по вопросу их государственной поддержки.

А.Г. Конопляников, М.А. Каплан, А.Ф. Цыб 56

Необходимость соответствия нормативно-правового регулирования реальному процессу создания и применения биомедицинских клеточных технологий.

Г.П. Пинаев 61

Страницы истории

К 100-летию со дня рождения выдающегося молекулярного биолога Сальвадора Лурия.

В.С. Воробьев 65

Хроника

События 2012 года 74

Правила для авторов 78

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

Derivation of mouse embryonic stem cells with inducible expression of human nerve growth factor.
S.A. Antonov, E.S. Manuilova, O.V. Dolotov, A.G. Kobylansky, S.V. Kostrov, D.R. Safina, N.V. Haydarova, I.A. Grivennikov 5

Effect of lipopolysaccharide *Azospirillum brasiliense* Sp245 on morphogenetic potential of wheat callus cells in vitro.
O.V. Tkachenko, N.V. Evseeva, Yu.V. Lobachev, L.Yu. Matora, V.V. Dmitrienko, G.L. Burygin, S.J. Shchyogolev 13

Genetic barcoding approach as to the identification of the person on the example of Russians of the Republic of Bashkortostan.
R.R. Garafutdinov, O.V. Chubukova, A.R. Sahabutdinova, V.A. Vakhitov, A.V. Chemeris 19

Study of content of biologically active substances in the culture medium bacterium *Pseudomonas aureofaciens* under storage.
Ju.A. Burova, S.A. Ibragimova, V.V. Revin 26

Short communications

The use of food additives on the basis of Vietnamese raw materials in the production fish sausages.
Ha Bich Pham, O.V. Bredihina 31

Reviews

How to avoid the appearance of false-positive results in a polymerase chain reaction?
A.V. Chemeris, E.G. Magdanov, R.R. Garafutdinov, V.A. Vakhitov 34

On the Complex program of biotechnology in the Russian Federation up to 2020 («BIO-2020»).
R.G. Vasilov, V.I. Trubnikov 46

Problem and the current state of hematopoietic stem cell transplantation in the Russian Federation.
B.V. Afanasyev 53

Experience Medical Radiological Research Center of Russian Ministry of Health in the field of biomedical cell technologies and proposals for the regulatory oversight of such work on their state aid.
A.G. Konoplyannikov, M.A. Kaplan, A.F. Tsyb 56

Compliance with regulatory actual process of creation and application of biomedical cell technologies.
G.P. Pinaev 61

Pages of history

On the 100th anniversary of the birth of the molecular biologist Salvador Luria.
V.S. Vorobyev 65

The chronicle

Events in 2012 74

Rules for authors 78

К читателям

В третьем номере за 2012 год помещен ряд крайне актуальных материалов. Прежде всего, необходимо отметить работы авторов из Уфы. Профессор А.В. Чемерис с коллегами представили обстоятельный обзор современного состояния проблемы ложно-положительных результатов при постановке полимеразной цепной реакции, а Р.Р. Гарафутдинов и др. сообщили о своих работах по генетическому штрих-кодированию с целью идентификации личности на примере популяции русских Республики Башкортостан.

Продолжают серию целенаправленных публикаций сотрудники Института молекулярной генетики РАН (Антонов С.А. и др.). На этот раз они изложили результаты, в которых ставилась задача получить эмбриональные стволовые клетки мышцы с индуцибельной экспрессией фактора роста нервов человека. В целом вектор этих работ направлен на поиск путей профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний.

Хороший подарок к 125-летию со дня рождения Н.И. Вавилова преподнесли сотрудники Саратовского государственного аграрного университета, носящего имя этого ученого, их земляка, сделавшего немало открытий на берегах Волги. Ими проведено изучение влияния липополисахарида *Azospirillum brasiliense* Sp245 на морфогенетический потенциал каллусных клеток *in vitro* (Ткаченко О.В. с соавт.).

Особенно хотелось бы подчеркнуть информационно-аналитическую статью об утверждении Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года («БИО-2020»). Это большое событие для отечественной биотехнологии, обещающее возродить былой авторитет нашей страны в данной области. Важно указать также на то, что в столь знаменитом правительственном решении сыграла свою роль активная позиция Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова и нашего журнала, в течение последних восьми лет пропагандировавшего эти идеи и предоставлявшего страницы для лидеров и энтузиастов в сфере биотехнологии.

В номере печатается несколько выступлений экспертов на круглом столе Государственной Думы ФС РФ, посвященном законодательному обеспечению биомедицинских клеточных технологий (Афанасьев Б.В., Конопляников А.Г., Пинаев Г.П.).

Наконец, публикуется небольшое краткое сообщение представителей ВНИРО и Московского государственного университета пищевых производств, которые информируют о возможностях разработки новой ресурсной базы в морской биотехнологии и аквакультурах.

Журнал не мог обойти такой круглой даты, как столетие со дня рождения одного из создателей молекулярной биологии Сальвадора Луриа, и откликнулся мемориальной статьей.

В разделе «Хроника» приводится решение парламентских слушаний Государственной Думы ФС РФ по вопросам законодательного регулирования оборота генно-модифицированных продуктов в РФ с соответствующими рекомендациями.

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

ПОЛУЧЕНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ С ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ ЧЕЛОВЕКА

С.А. АНТОНОВ*, Е.С. МАНУИЛОВА, О.В. ДОЛОТОВ, А.Г. КОБЫЛЯНСКИЙ, С.В. КОСТРОВ, Д.Р. САФИНА, Н.В. ХАЙДАРОВА, И.А. ГРИВЕННИКОВ

ФГБУН «Институт молекулярной генетики» РАН, Москва

С использованием комплекса молекулярно-биологических методов получены клоны эмбриональных стволовых клеток мыши, способные секретировать биологически активный трансгенный человеческий фактор роста нервов в культуральную среду. Были отобраны продуценты с относительно низкими уровнями базальной и высокими уровнями индуцированной экспрессии человеческого фактора роста нервов.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки, фактор роста нервов.

Введение

Фактор роста нервов (ФРН) — наиболее изученный представитель семейства нейротрофинов, белков, необходимых для формирования и функционирования зрелой нервной системы. ФРН является высококонсервативным белком, обнаруженным у всех классов позвоночных — от круглоротых до млекопитающих, включая человека [9]. У млекопитающих и человека фактор роста нервов определяет фенотип и численность ряда нейрональных популяций ЦНС и ПНС, таких как гиппокамп и базальные ядра переднего мозга [8, 16], симпатические и спинномозговые ганглии [10].

В этих популяциях нейронов ФРН регулирует их выживаемость, экспрессию ферментов синтеза нейромедиаторов и направление роста аксонов. ФРН усиливает пролиферацию нейрональных предшественников, образующихся как в ходе эмбриогенеза [5, 16], так и при регенеративных процессах в сформированной нервной системе [7, 18]. ФРН способен останавливать апоптоз в нейронах при гипоксическом, окислительном стрессе и аксотомии [11–13]. Дефицит нейротрофинов не позволяет нервной системе реализовать полностью свой регенеративный потенциал при травмах спинного

мозга и ишемическом инсульте [15]. На животных моделях болезни Паркинсона [6], болезни Альцгеймера [3] и фокальной ишемии [15] показано, что введение ФРН снижает гибель нейронов и тем самым уменьшает проявление симптомов этих патологических состояний.

Терапевтический потенциал ФРН ограничивается его коротким временем полураспада и ограниченной способностью к пассивной диффузии в нервной ткани при инъекционном введении [18]. Перспективным способом доставки терапевтических факторов роста в ткани является трансплантация клеток, секретирующих данные факторы. При этом одновременно возможно замещение утраченных клеток реципиента трансплантированными клетками и обеспечение трофической поддержки для трансплантата и его окружения за счет секреции терапевтического ростового фактора. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) благодаря своей плюрипотентности и способности к неограниченной пролиферации *in vitro* могут служить источником любых типов дифференцированных клеток, в том числе клеток нервной системы, пригодных для трансплантации. Кроме того, ЭСК мышцы могут быть трансфицированы или трансдуцированы конструкциями, несущими гены терапевтических ростовых факторов.

Индукцибельные конструкции, регулирующие уровень экспрессии трансгена, дают возможность управлять дозой и временем поступления интересующего ростового фактора. Для ЭСК существует ряд систем индукцибельной экспрессии, такие как система Tet-On и подобные ей конструкции на основе бактериального тетрацикли-

© 2012 г. Антонов С.А., Мануилова Е.С., Долотов О.В., Кобылянский А.Г., Костров С.В., Сафина Д.Р., Хайдарова Н.В., Гривенников И.А.

* **Автор для переписки:**

Антонов Станислав Анатольевич, мл.н.с.
Институт медицинской генетики РАН
123182 Москва, пл. Акад. Курчатова, 2

нового оперона. Недостатком этих систем является необходимость введения в геном дополнительных регуляторных элементов, обеспечивающих восприимчивость к индуктору. Альтернативой этих систем представляется использование эндогенных регуляторных элементов, таких как система металлотионеина. Металлотионеины (МТ) — белки, выполняющие широкий спектр функций в клетке, связанных с обменом и выведением двухвалентных ионов тяжелых металлов. Эти белки эволюционно высококонсервативны и универсальны для всех типов клеток [17]. Промотор МТ (Р МТ-1) обеспечивает конститутивную экспрессию своего оперона, которая значительно усиливается при повышении внутриклеточной концентрации Zn^{2+} , Cu^{2+} и Cd^{2+} . Конструкции на основе Р МТ использовались в широком ряде работ как для получения трансгенных клеточных линий, так и трансгенных животных [14, 18]. Экспрессия трансгенов под регуляцией Р МТ может сильно варьировать, и в нескольких работах для получения продуцентов с индуцибельной экспрессией проводилось клонирование трансгенных линий [18].

Нами была получена конструкция, в которой ген пре-про пептида ФРН человека находится под регуляцией металлотионеинового промотора мышцы Р МТ-1. Данным вектором были стабильно трансфицированы ЭСК мышцы линии R1, и полученные линии подвергнуты клонированию. В настоящей работе с целью повышения эффективности процедуры клонирования мы применили автоматизированную систему селекции и отбора клеток Clone Pix FL. В отобранных нами клонах были измерены уровни экспрессии трансгенного человеческого ФРН, а также показана экспрессия этими клетками маркеров, специфичных для ЭСК.

Материалы и методы

Культуры клеток. Эмбриональные фибробласты мышцы выделялись из 13–14-дневных эмбрионов мышцы 129 линии по стандартной методике [1]. Фибробласты культивировались на чашках Петри диаметром 35 мм в среде DMEM (Gibco, США) с 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин (ICN, США) и 80 мкг/мл гентамицина. Для получения фидерного слоя фибробласты обрабатывались митомицином С (1,5 часа, 3 мкг/мл) в ростовой среде и после этого три раза отмывались раствором Хэнкса. На следующий день фидерные слои использовались для посева ЭСК.

ЭСК мышцы линии R1 культивировались в среде α -MEM (Gibco, США), с 15% фетальной бычьей

сыворотки, 2 мМ L-глутамин и добавками 20 мкМ смеси витаминов, 100 мкМ заменимых аминокислот, 100 мкМ пирувата натрия, 80 мкМ меркаптоэтанола (ICN, США) и 20 мкг/мл гентамицина. ЭСК культивировались в чашках Петри, которые обрабатывались 0,1% желатином или на чашках с фидерным слоем эмбриональных фибробластов мышцы. При культивировании ЭСК на чашках, покрытых желатином, в культуральную среду также добавлялся рекомбинантный LIF в концентрации 10 нг/мл.

Клетки PC12 культивировались в среде RPMI с 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ глутамин и 80 мкг/мл гентамицина. Все клеточные культуры поддерживались в CO_2 инкубаторе в атмосфере 5% CO_2 и при температуре 37 °С.

Получение векторов. Вектор pMT-NGF был получен на основе коммерчески доступного вектора pcDNA3.1(+) (Invitrogen, США), несущего ген устойчивости к селективному антибиотику неомицину. Последовательность, кодирующая зрелую мРНК человеческого пре-про ФРН (hNGF), ранее клонирована в вектор pUC19 из библиотеки кДНК из мозжечка человека сотрудниками лаборатории белковой инженерии Института молекулярной генетики РАН [2]. Эта последовательность была амплифицирована из pUC-NGF с использованием полимеразы Pfu и праймеров, специфичных первым и последним 15 нуклеотидам человеческого ФРН, также несущим некоплементарные матричные участки, соответствующие сайтам рестрикции — HindIII и BamHI.

Ампликон был рестрицирован по HindIII и BamHI и лигирован в полилинкер pcDNA3.1(+), рестрицированный по тем же сайтам. Последовательность металлотионеинового промотора Р МТ-1 была клонирована из вектора pBS-MT по сайтам EcoRI — HindIII. pcDNA-NGF была рестрицирована по сайтам BglIII и HindIII, при этом вырезался фрагмент CMV промотора и в рестрицированный вектор с помощью короткого олигонуклеотидного линкера BglIII-EcoRI лигировался фрагмент pBS-MT. Схема векторов приведена на рисунке 1. Полученный вектор анализировался с помощью рестрикционного анализа, а также с помощью секвенирования с праймерами, специфичными к Р МТ-1 и ФРН человека.

Контрольный вектор pcMT был получен рестрикцией pMT-NGF по сайтам HindIII и BamHI, обработкой фрагментом Кленова и лигированием полученного линейного фрагмента по образовавшимся тупым концам.

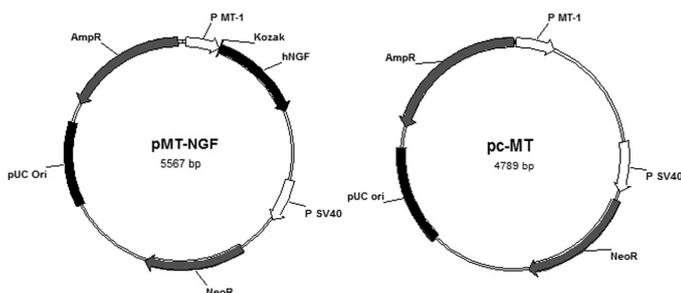


Рис. 1. Схема векторов рМТ-NGF и рс-МТ

Трансфекция. За 48 ч до проведения трансфекции ЭСК высевались на 35 мм чашки Петри, покрытые желатином, по 6×10^4 клеток на чашку, в среду с LIF. Перед проведением трансфекции среда заменялась на такую же, но с 10% фетальной бычьей сыворотки. Заранее готовились растворы плазмидной ДНК (1,5 мкг/50 мкл PBS) и метафектена (10 мкл/50 мкл PBS; Biontech, ЕС). Их смешивали и инкубировали 30 минут. Смесь ДНК и метафектена в PBS добавлялась к клеткам, которые затем помещались в CO_2 -инкубатор на 4 часа. После этого осуществлялась замена среды на стандартную с 15% фетальной бычьей сыворотки и LIF, и клетки культивировались 72 часа и пересевались. Затем в среду вводился селективный антибиотик неомицин в концентрации 25 мкг/мл. После инкубации в течение 2–3 суток клетки снова пересевались на селективную среду. Через 3 пассажа на селективной среде гибели в культурах практически не наблюдалось.

Клонирование. Клонирование ЭСК осуществлялось двумя методами — стандартным методом разведения и с использованием автоматизированной системы для селекции и отбора животных клеток Clone Pix FL (Molecular Devices, Великобритания). В первом случае клеточная суспензия известной концентрации повторно разводилась в ростовой среде в два раза, с контрольным подсчетом в камере Горяева до достижения концентрации 16500 кл/мл. После этого повторные разведения осуществлялись без подсчета до достижения расчетной концентрации 10–20 кл /мл. Полученная разведенная суспензия высевалась по 100 мкл в покрытые 0,1% желатином лунки 96-луночного планшета в 100 мкл стандартной среды для ЭСК с 20 нг/мл LIF.

Система отбора и селекции клонов Clone Pix FL, состоящая из фото/флуоресцентного детектора и пневматического робота-манипулятора, позволяет сканировать и изолировать отдельные клоны из больших популяций клеток, основываясь на морфологических критериях, экспрессии флуоресцентных маркеров и/или окраши-

вании с помощью флуоресцентно меченных антител к поверхностным антигенам.

При проведении процедуры клонирования с помощью автоматизированной системы Clone Pix FL культуры ЭСК, подлежащих разделению, высевались в 6-луночные планшеты Genetix по 6×10^4 клеток на лунку в среду с LIF. На 3-е сутки планшеты с клетками размещались в приборе. После этого проводилось сканирование колоний в проходящем свете и отбор отдельных клонов. Отдельными клонами считались колонии, находящиеся на расстоянии не менее 2 радиусов колонии друг от друга. Отбирались только округлые колонии, имеющие правильную морфологию и размеры 50–150 мкм. Отобранные колонии переносились на 96-луночные планшеты, покрытые 0,1% желатином с 10 нг/мл LIF, и культивировались 2 дня, после чего проводился пересев клеток.

Выделение ДНК и ПЦР. ЭСК исследуемых линий стандартно снимались с чашек трипсином, клетки в суспензии подсчитывались. Клетки (5×10^5) осаждались центрифугированием, затем пипетировались в 60 мкл дистиллированной воды, нагревались до 100°C 10 минут, охлаждались на льду, обрабатывались раствором протеиназы К в дистиллированной воде (4 мг/мл) 4 часа при 37°C . Лизаты центрифугировались, надосадочная жидкость отбиралась и использовалась в качестве матрицы для ПЦР.

ПЦР-анализ проводился с парами праймеров, специфичных к клонированной последовательности человеческого ФРН. В качестве референсного гена применялся актин. Условия реакции в обоих случаях: 95°C — 30 сек.; 63°C — 30 сек.; 72°C — 1 мин.

Выделение, очистка РНК и ОТ-ПЦР. Выделение тотальной РНК осуществлялось с помощью наборов Рибозоль А (ИнтерЛабСервис, Россия) по протоколу, данному производителем. Образцы обрабатывали раствором ДНКазы I (Fermentas, ЕС) по модифицированному протоколу — 1,5 ч в реакционном буфере с 0,6 мМ MnCl_2 , 40 мМ Tris, 1 мМ CaCl_2 . Затем ДНКазу инактивировали нагреванием ($+65^\circ\text{C}$, 10 мин.), а полученные образцы хранили при -70°C . Обратная транскрипция проводилась с набором на основе M-MLV транскриптазы (Силекс, Россия) по протоколу, данному производителем. ПЦР ставилась с парами праймеров, специфичных к GAPDH, OGT4 мыши и ФРН человека. Условия реакции во всех случаях: 95°C — 1 мин.; 62°C — 1 мин.; 72°C — 1,5 мин. Последовательность праймеров представлена в таблице 1.

Последовательность праймеров

Ген	Последовательность праймера	Кол-во циклов ПЦР
Актин	5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGGC 5'-CAGGTCCAGACGCAGGATGGC	35
hNGF full	5'-AAGCTT GCCACC ATGTCCATGTTGTTC 5'-CGTGTCCGGATCCTCAGGCTCTTCT	36
hNGF RT-PCR	5'-GACTAAACTTCAGCATTCCC 5'-TAATGCTCACCTCTCCCAAC	38
GAPDH	5'-CCGATGCCCCCATGTTTGTGA 5'-GGCCATGTAGGCCATGAGGTC	35
OCT4	5'-TGGAGACTTTGCAGCCTGAG 5'-CATACTCTTCTCCGTTGGGAATA	37

Выделение белков и ИФА. Клетки снимали трипсином, клетки в суспензии подсчитывались и $1-2 \times 10^6$ клеток лизировали в RIPES буфере (рН=8,0) с 5 мМ EDTA, 5 мкг/мл леупептина, 2 мкг/мл апротинина и 0,5 мМ фенилметилсульфонилфторида. Образцы инкубировались 2 ч на льду, затем 40 мин. центрифугировались при 15000 об./мин., надосадочная жидкость отбиралась. Полученные лизаты ацидифицировались раствором HCl до рН=2, инкубировались на льду 20 мин., кислота нейтрализовалась NaOH до рН=7,5. После этого образцы снова центрифугировались 40 мин. при 15000 об./мин. и надосадочная жидкость, содержащая растворимую белковую фракцию, отбиралась и использовалась для постановки ИФА.

Иммуноферментный анализ проводился с набором NGF ImmunoMax Assay (Promega, ЕС) по протоколу, данному производителем.

Определение активности эндогенной щелочной фосфатазы. Анализируемые культуры клеток фиксировали метанолом при +4 °С 10 минут, промывали PBS и обрабатывали окрашивающим раствором (2 мМ BCIP, 2 мМ NBT в 1 М диэтаноламине с 50 мМ MgCl₂; рН=9,8) в течение 12 мин. Окрашивающий раствор удалялся, препараты промывались водой, заключались под покровные стекла и исследовались под микроскопом.

Результаты и обсуждение

Для получения трансгенных линий ЭСК, экспрессирующих ФРН, был сконструирован плазмидный вектор рMT-NGF, в котором последовательность пре-про NGF находится под управлением индуцибельного промотора металлотионеина мышцы-1 (Р MT-1). Также был сконструирован контрольный вектор рсMT, пред-

ставляющий плазмиду рMT-NGF, но без вставки исследуемого трансгена. Нуклеотидные последовательности векторов подтверждены с помощью рестрикционного анализа и секвенирования.

Индукторами промотора Р MT-1 являются ионы двухвалентных тяжелых металлов, такие как Zn²⁺ и Cd²⁺. Для определения возможности использования этой системы индукции в ЭСК мыши мы оценили токсичность цинка на клетках линии R1 в диапазоне концентраций 50–300 мкМ при времени инкубации 72 ч. В проводимых ранее исследованиях с другими клеточными линиями, трансфицированными конструкциями на основе Р MT-1, авторы указывали, что концентрация Zn²⁺ 300 мкМ была «более чем достаточной... для индукции трансгенной экспрессии» [18].

Ацетат цинка добавлялся в культуральную среду к ЭСК до указанных выше конечных концентраций через 24 ч после посева, а еще через 72 ч проводился МТТ-тест и морфологическая оценка колоний. В данных условиях цинк не проявлял цитотоксичности.

Однако при добавлении ацетата цинка в культуральную среду к ЭСК сразу при посеве уже в концентрации 150 мкМ наблюдается снижение скорости пролиферации, что предположительно связано с большей восприимчивостью неприкрепившихся клеток, обработанных трипсином.

С помощью липосомального реагента Metafectene векторами рMT-NGF и рсMT были трансфицированы ЭСК мыши линии R1. Стабильно трансфицированные клетки отобраны на среде, содержащей селективный антибиотик неомицин.

Из устойчивых к неомицину ЭСК после 5-го пассажа на селективной среде выделялась геномная ДНК и анализировалась с помощью ПЦР на наличие трансгенной

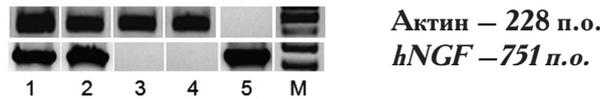


Рис. 2. Определение геномной интеграции ФРН в ЭСК R1 с помощью ПЦР. Верхний ряд — актин, нижний ряд — ФРН. 1, 2 — ДНК из клеток линии R1-МТ-NGF на 7- и 11-м пассажах, соответственно; 3 — ДНК из клеток исходной линии R1; 4 — ДНК из клеток контрольной линии рсМТ; 5 — вектор рМТ-NGF. М — маркер длин фрагментов. Размер продуктов актин — 228 п.о., ФРН — 751 п.о.

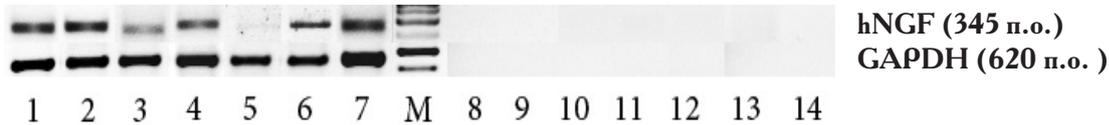


Рис. 3. ОТ-ПЦР-анализ экспрессии человеческого ФРН в клонах рМТ-NGF, культивируемых в стандартной среде и в среде, содержащей 150 мкМ Zn^{2+} . Верхний ряд — ФРН (hNGF), нижний ряд — референсный ген GAPDH. Слева — исследуемые образцы. Справа — контроли контаминации геномной ДНК, те же образцы, в которые при проведении ОТ не добавлялся фермент обратная транскриптаза М-MLV. 1, 2 — клон 14 в стандартной среде и с добавлением 150 мкМ Zn^{2+} , соответственно; 8, 9 — те же образцы без М-MLV; 3, 4 — клон 21 в стандартной среде и с добавлением 150 мкМ Zn^{2+} , соответственно; 10, 11 — те же образцы без М-MLV; 5, 6 — клон 6 в стандартной среде и с добавлением 150 мкМ Zn^{2+} , соответственно; 12, 13 — те же образцы без М-MLV; 7 — положительный контроль — иммортализованные фибробласты человека СН-1; 14 — СН-1 без ОТ. М — весовой маркер. Размер продуктов hNGF (ФРН) — 345 п.о., GAPDH — 620 п.о.

вставки ФРН. С помощью праймеров, специфичных к клонированной последовательности ФРН, было показано, что полноразмерный фрагмент ФРН интегрировался в геномную ДНК линии R1-МТ-NGF (рис. 2). Из трансгенных клеток, устойчивых к неомицину, выделялась тотальная РНК, которая затем анализировалась с помощью ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. В клетках линии R1-МТ-NGF оценивалась базальная и индуцибельная экспрессия мРНК трансгенного ФРН. Для исследования индуцибельной экспрессии трансгена РНК выделялась из клеток, культивируемых 48 ч в среде, содержащей 150 мкМ Zn^{2+} . Было показано наличие детектируемой экспрессии трансгена в полученной линии R1-МТ-NGF. Однако уровень экспрессии в клетках R1-МТ-NGF, культивируемых в стандартной среде, или в среде, содержащей индуктор цинк, практически не отличался (данные не приводятся). Поскольку копияемость вставки и область встраивания плазмидной ДНК при трансфекции различны между клетками получаемой популяции, это приводит к ее гетерогенности и наличию в ней трансфектантов с различными уровнями базальной и индуцибельной экспрессии трансгена.

Для отбора клеток с высокой индуцибельной экспрессией трансгена при низкой базальной экспрессии и выделения клеток с наиболее высокой экспрессией человеческого ФРН полученная линия R1-МТ-NGF была клонирована. Процедура клонирования осуществлялась

традиционным методом последовательного разведения или с помощью автоматизированной системы селекции и отбора клонов селекции Genetix Clone Pix FL. Суммарно было получено более 40 клонов от исходной линии R1-МТ-NGF. Использование автоматизированного метода заметно сокращало время от момента клонирования до получения клеток в количестве, достаточном для криоконсервации и ПЦР-анализа. Это связано с возможностью изолировать сразу колонии, а не одиночные клетки, что одновременно повышает процент выживаемости клонов и исходную скорость их роста.

Полученные клоны наращивались, подвергались криоконсервации и анализу экспрессии трансгенного человеческого ФРН, а также маркеров ЭСК. В качестве маркеров ЭСК оценивались активность щелочной фосфатазы и экспрессия транскрипционного фактора OCT4.

Для анализа базальной и индуцибельной экспрессии трансгенного человеческого ФРН клоны R1-МТ-NGF культивировались в среде в присутствии или в отсутствие индуктора цинка в концентрации 150 мкМ. Из клеток выделялась РНК, которая анализировалась с помощью ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией (рис 3). Клоны с максимальным базальным уровнем мРНК ФРН (например, рис. 3, № 14) и те, в которых цинк оказывал наиболее выраженное индуцирующее действие на экспрессию трансгенной мРНК (рис. 3, № 6, 21), отбирались.

**Определение уровня тотального ФРН в клетках исследуемых линий
и в кондиционированных средах от них**

Клеточная линия или клон	Уровень ФРН в клетках, пг/млн. клеток	Уровень ФРН в среде, пг/мл
R1-MT-NGF клон 6	0	36,1
R1-MT-NGF клон 6 + 150 мкМ Zn ²⁺	15,3	182,6
R1-MT-NGF клон 14	4,5	158,5
R1-MT-NGF клон 14 + 150 мкМ Zn ²⁺	12,1	201,3
R1-рс-MT	0	0
R1-рс-MT + 150 мкМ Zn ²⁺	0	0
R1 исходная линия	0	0

В отобранных клонах и кондиционированных средах от них проводилось количественное измерение уровня тотального ФРН с помощью иммуноферментного анализа (табл. 2). В клоне 6 было показано максимальное соотношение базальной и индуцированной экспрессии трансгена. У этого клона добавление цинка увеличивало уровень секреции ФРН в среду в 5 раз. В клоне 14 наблюдался наиболее высокий уровень трансгенного белка в среде (201 пг/мл). В самих трансгенных клетках ФРН практически не накапливался. Также ФРН не секретировался в среду и не накапливался в клетках исходной линии R1 и контрольной линии рсMT.

Для определения наличия биологической активности у секретируемого в среду трансгенного белка мы использовали модель дифференцировки клеток феохромоцитомы крысы линии РС12. При культивировании в среде, содержащей ФРН, клетки РС12 дифференцируются и приобретают нейрональный фенотип. Отношение числа дифференцированных и недифференцированных

клеток в популяции зависит от концентрации ФРН в среде и может быть использовано для количественной оценки его биологической активности. Были получены кондиционированные среды от исследуемых клонов (№ 6, 14, 21) R1-MT-NGF, культивируемых в присутствии и в отсутствие индуктора, и этими средами обрабатывались клетки РС12. В качестве контроля применялись среды от клеток линии рс-MT, а также стандартная культуральная среда для ЭСК. В качестве положительного контроля использовался рекомбинантный человеческий ФРН. Кондиционированные среды от клеток исследуемых клонов 6 и 14 вызывали у РС12 образование нейритов, что свидетельствует о наличии не менее 1 нг/мл (соответствует концентрации 1 нМ при ожидаемой массе 13 кДа) биологически активного ФРН, секретируемого клонами R1-MT-NGF (рис. 4). В то же время кондиционированные среды от исходной линии R1 и контрольной линии R1-рсMT не вызывали изменения фенотипа РС12.

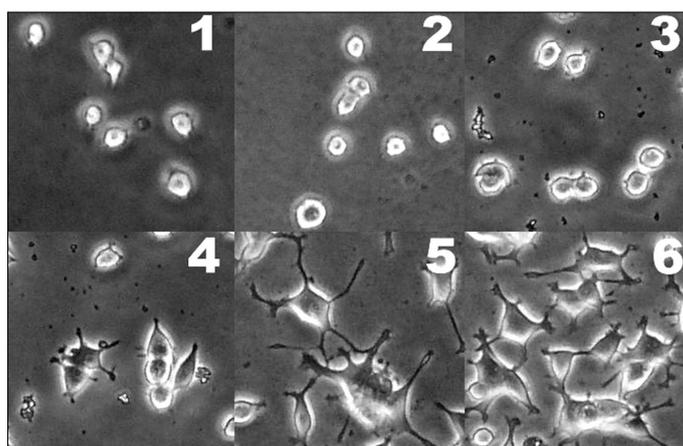


Рис. 4. Эффекты кондиционированных сред, полученных от клеток исследуемых линий, на дифференцировку клеток феохромоцитомы РС12. 1 — стандартная ростовая среда RPMI с 10% фетальной бычьей сыворотки; 2 — ростовая среда для ЭСК с 15% фетальной бычьей сыворотки; 3 — кондиционированная среда от клеток линии рсMT; 4 — кондиционированная среда от клеток R1-MT-NGF клона 6; 5 — кондиционированная среда от клеток R1-MT-NGF клона 6, культивируемых в присутствии 150 мкМ Zn²⁺; 6 — среда для ЭСК с добавлением рекомбинантного человеческого ФРН, 5 нг/мл



Рис. 5. Анализ экспрессии транскрипционного фактора ОСТ4 в клонах R1-МТ-NGF, клетках исходной линии R1 и контрольной линии рсМТ. Верхний ряд — GAPDH, нижний ряд — ОСТ4. Слева — исследуемые образцы, справа — контроли контаминации геномной ДНК, те же образцы, в которые при проведении ОТ не добавлялся фермент обратная транскриптаза M-MLV. 1 — клеточная линия R1; 2 — R1-МТ-NGF клон 6; 3 — R1-МТ-NGF клон 14; 4 — R1-МТ-NGF клон 21; 5 — линия R1-МТ-NGF; 6 — линия R1-рсМТ; 7 — эмбриональные фибробласты мыши (отрицательный контроль). М — весовой маркер. Размер продуктов: GAPDH — 620 п.о., ОСТ4 — 502 п.о.

Экспрессирующие человеческий ФРН клоны (рис. 5, № 6, 14, 21) анализировались затем с помощью ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией, на наличие экспрессии транскрипционного фактора ОСТ4, специфичного для ЭСК. Показано, что экспрессия ОСТ4 не отличалась в клонах R1-МТ-NGF, исходной линии R1 и контрольной линии рсМТ (см. рис. 5). Это свидетельствует о сохранении транскрипции генов, характерных для плюрипотентных ЭСК, полученными клонами R1-МТ-NGF.

С помощью цитохимического теста на щелочную фосфатазу было показано, что ее активность одинаково высока в клетках исходной линии R1 и в клетках полученных клонов R1-МТ-NGF (рис. 6). Эти данные также свидетельствуют о сохранении фенотипа плюрипотентных ЭСК, клетками полученных клонов R1-МТ-NGF, а также клетками контрольной линии рс-МТ.

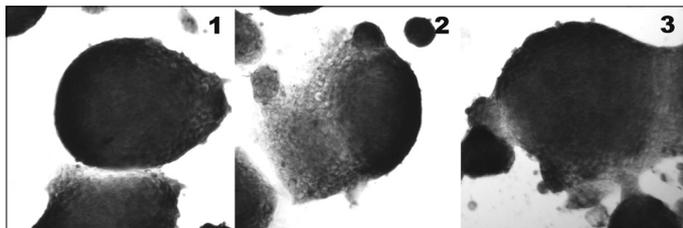


Рис. 6. Активность поверхностной щелочной фосфатазы в ЭСК исследуемых линий. 1 — клетки исходной линии R1; 2 — клетки R1-МТ-NGF (клон 6); 3 — клетки R1-рс-МТ

Было проведено сравнение пролиферативной активности и способности формировать эмбрионидные тела между клетками клонов 6- и 14-й линий R1-МТ-NGF и клетками линии R1-рсМТ. Регулярный подсчет клеток на 72 ч пролиферации в присутствии LIF не выявил отличий в скорости пролиферации между вышеперечисленными линиями. Также проводился подсчет эмбрионидных тел, сформированных из $1,2 \times 10^4$ — 2×10^4 клеток, посеянных на 72 ч без LIF в чашки Петри, не обработанные желатином, который не показал различий между исследуемыми линиями.

Заключение

Таким образом, получены клоны ЭСК, способные секретировать биологически активный трансгенный человеческий ФРН в культуральную среду. Были отобраны продуценты с относительно низкими уровнями базальной и высокими уровнями индуцированной экспрессии человеческого ФРН. В дальнейшей работе полученные клоны R1-МТ-NGF предполагается использовать для изучения процессов дифференцировки ЭСК in vitro, а также для исследования потенциальных терапевтических эффектов этих клеток в условиях трансплантации животным с моделями нейродегенеративных расстройств.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования Института молекулярной генетики РАН «Центр клеточных и генных технологий» при поддержке РФФИ ГК № 12-08-00014-а.

Литература

1. Гордеева О.Ф., Мануилова Е.С., Гривенников И.А. и др. Характеристика плюрипотентной популяции на начальных стадиях дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в культуре // Докл. АН. — 2002. — Т. 386. — № 3. — С. 555–558.
2. Рафиева Л.М., Сафина Д.Р., Демидюк И.В., Костров С.В. Получение рекомбинантных нейротрофинов человека для биомедицинских исследований // Вестник МИТХТ. — 2011. — Т. 6. — № 2. — С. 51–57.
3. Allen S.J., Watson J.J., Dawbarn D. The neurotrophins and their role in Alzheimer's disease // Curr Neuropharmacol. — 2011 Dec. — Vol. 9(4). — P. 559–573.
4. Aloe L. and Micera A. Nerve growth factor: basic findings and clinical trials // Biomedical Reviews. — 1999. — Vol. 10. — P. 3–14.
5. Cattaneo E., McKay R. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor // Nature. — 1990. — Vol. 347(6295). — P. 762–765.

6. *Chen L.W., Yung K.K., Chan Y.S., Shum D.K., Bolam J.P.* The proNGF- ρ 75NTR-sortilin signalling complex as new target for the therapeutic treatment of Parkinson's disease // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* – 2008 Dec. – Vol. 7(6). – P. 512–523.
7. *Colafrancesco V., Villoslada P.* Targeting NGF-pathway for developing neuroprotective therapies for multiple sclerosis and other neurological diseases // *Archives Italiennes de Biologie.* – 2011. – Vol. 149. – P. 183–192.
8. *Conner J.M., Franks K.M., Titterness A.K., Russel K.L., Merrill D.A., Christie B.R., Sejnowski T.J. and Tuszyński M.H.* NGF is essential for hippocampal plasticity and learning // *J. Neurosci.* – 2009. – Vol. 29(35). – P. 10883–10889.
9. *Dethleffsen K., Heinrich G., Lauth M., Knapik W., and Meyera M.* Insect-containing neurotrophins in teleost fish and their relationship to nerve growth factor // *Molecular and Cellular Neuroscience* – 2003. – Vol. 24. – P. 380–394.
10. *Ernsberger U.* Role of neurotrophin signalling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia // *Cell Tissue Res.* – 2009. – Vol. 336. – P. 349–384.
11. *Kwon Y.K.* Effect of neurotrophic factors on neuronal stem cell death // *J. of Biochemistry and Molecular Biology.* – 2002. – Vol. 35. – No. 1. – P. 87–93.
12. *Mohiuddin L., Delcroix J.D., Fernyhough P., Tomlinson D.R.* Focally administered nerve growth factor suppresses molecular regenerative responses of axotomized peripheral afferents in rats // *Neuroscience.* – 1999. – Vol. 91(1). – P. 265–271.
13. *Salinas M., Diaz R., Abraham N.G., Ruiz de Galarreta C.M., and Cuadrado A.* Nerve growth factor protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner // *J. of Biological Chemistry.* – 2003. – Vol. 278. – No. 16. – P. 13898–13904.
14. *Shen J., Gudas L.J.* Molecular cloning of a novel retinoic acid-responsive gene, HA1R-62, which is also up-regulated in Hoxa-1-overexpressing cells // *Cell Growth Differ.* – 2000 Jan. – Vol. 11(1). – P. 11–17.
15. *Tonchev A.B.* Brain ischemia, neurogenesis, and neurotrophic receptor expression in primates // *Archives Italiennes de Biologie.* – 2011. – Vol. 149. – P. 225–231.
16. *Volosin M., Song W., Almeida R.D., Kaplan D.R., Hempstead B.L., and Friedman W.J.* Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: roles of neurotrophins and proneurotrophins // *J. Neurosci.* – 2006. – Vol. 26(29). – P. 7756–7766.
17. *Waldron K.J., Rutherford J.C., Ford D., Robinson N.J.* Metalloproteins and metal sensing // *Nature.* – 2009. – Vol. 460. – P. 823–830.
18. *Wyman T.C., Rohrer D.C., Kirigiti P., Nichols H.V., Pilcher K.Y., Nilaver G. and Machida C.A.* Promoter-activated expression of nerve growth factor for treatment of neurodegenerative diseases // *Gene Therapy.* – 1999. – Vol. 6. – P. 1648–1660.

Список сокращений

МТ – металлотионеин,

ОТ – обратная транскрипция,

ПНС – периферическая нервная система,

ПЦР – полимеразная цепная реакция,

ФРН – фактор роста нервов,

ЦНС – центральная нервная система,

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки,

GAPDH – glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (глицеральдегидфосфатдегидрогеназа),

LIF – фактор, ингибирующий лейкемию.

DERIVATION OF MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS WITH INDUCIBLE EXPRESSION OF HUMAN NERVE GROWTH FACTOR

S.A. ANTONOV, E.S. MANUILOVA, O.V. DOLOTOV, A.G. KOBLYANSKY, S.V. KOSTROV,
D.R. SAFINA, N.V. HAYDAROVA, I.A. GRIVENNIKOV

Institute for Molecular Genetics, RAS, Moscow

With the use of complex molecular biological techniques derived clones of embryonic stem cells capable of secreting a biologically active transgenic human nerve growth factor in the culture medium. Were selected producers with relatively low levels of basal and induced expression of high levels of human nerve growth factor.

Keywords: embryonic stem cells, nerve growth factor.

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *AZOSPIRILLUM BRASILIENSE* Sp245 НА МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КАЛУСНЫХ КЛЕТОК ПШЕНИЦЫ IN VITRO

О.В. ТКАЧЕНКО^{1*}, Н.В. ЕВСЕЕВА², Ю.В. ЛОБАЧЕВ¹, Л.Ю. МАТОРА², В.В. ДМИТРИЕНКО², Г.Л. БУРЫГИН², С.Ю. ЦЕГОЛЕВ²

¹ ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»,

² ФГБУН «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» РАН, Саратов

В работе показано, что липополисахарид ассоциативных бактерий *Azospirillum brasiliense* Sp245 стимулирует процессы вторичной дифференциации и регенерационную способность калусных клеток пшеницы, повышая эффективность культивирования генотипов с низким эмбриогенным потенциалом. Наибольшей физиологической активностью в отношении калусных клеток обладает липополисахарид, присутствующий в среде культивирования в концентрации 10 мг/л. Полученные результаты могут быть использованы для повышения морфогенетической компетентности растительных объектов, в частности пшеницы, в культуре in vitro.

Ключевые слова: калус, пролиферативный антиген инициалей, *Triticum aestivum* L., *Azospirillum brasiliense*, морфогенез, in vitro.

Введение

Основным условием культивирования растительных объектов in vitro является реализация клетками их морфогенетического потенциала. Традиционно ведется поиск физических и химических факторов, повышающих способность калусных клеток к вторичной дифференциации и эффективность регенерации растений. В то же время показано, что стимулировать морфогенез и рост растений in vitro могут ассоциированные с тканевыми культурами мезофильные бактерии (Каляева М.А., 2001, 2003) [4, 5] и бактерии рода *Azospirillum* (Волкогон В.В. и др., 2006) [1].

Однако инокуляция растений целыми бактериальными клетками в культуре in vitro связана с методическими сложностями (Ильчуков В.В., 2012) [3]. В этой связи представляется целесообразным оценить

воздействие на экспланты отдельных компонентов бактериальной клетки, участвующих во взаимодействиях бактерий с растением. Ранее было установлено, что липополисахарид (ЛПС) наружной мембраны ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* служит активным компонентом бактерий, определяющим контактные взаимодействия с корнями растений (Федоненко Ю.П. и др., 2001) [8] и принимающим участие в процессах, индуцирующих ответные реакции растений на эти взаимодействия (Matora L.Yu. et al., 1995 [12]; Evseeva N.V. et al., 2011 [9]).

Целью настоящей работы являлось определение влияния ЛПС бактерий *A. brasiliense* Sp245 на морфогенетический потенциал соматических тканей мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в культуре in vitro.

Материалы и методы

Исследования проводили в течение трех лет (2009–2011 гг.) с использованием генетической модели, включающей в себя две почти изогенные линии сорта Саратовская 29 яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Линии различаются по высоте растений: одна из них несет ген редукции высоты побега (аллель RhtB1c), а другая — высокорослый сибс (несет аллель RhtB1a). Изогенные линии были получены Ю.В. Лобачевым методом возвратных скрещиваний (Лобачев Ю.В., 2000) [6].

© 2012 г. Ткаченко О.В., Евсеева Н.В., Лобачев Ю.В., Матора Л.Ю., Дмитриенко В.В., Бурьгин Г.Л., Цеголев С.Ю.

* **Автор для переписки:**

Ткаченко Оксана Викторовна,
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент,
кафедра растениеводства, селекции и генетики
Саратовского государственного аграрного университета
имени Н.И. Вавилова

Тел.: +7 (8452) 23-46-97

Факс: +7 (8452) 26-27-83

E-mail: oktkachenko@yandex.ru.

Донорные растения выращивали в полевых условиях. В качестве эксплантов для получения соматических каллусов использовали незрелые (14-суточные) зародыши пшеницы. Контролем служила среда Линсмайера – Скуга с 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д). В опытных вариантах в стандартную среду после автоклавирования вводили ЛПС, выделенный из наружной мембраны бактерий *A. brasiliense* Sp245 методом Лейве с соавторами (Leive L. et al., 1968) [11], в концентрации 1, 10 и 100 мг/л. В каждом варианте на питательную среду для каллусогенеза помещали по 100 зародышей.

На 30-е сутки методом визуального контроля (He D.G. et al., 1986) [10] оценивали количество всех образовавшихся каллусов и каллусов с очагами меристематической активности, а также определяли сырую массу разных типов каллусов. Полученные морфогенные каллусы переносили на среду того же состава, но без 2,4-Д с 0,5 мг/л индолилуксусной кислоты и 0,5 мг/л кинетина для регенерации растений. Морфологические параметры регенерантов определяли через 20 суток.

Кроме того, в каллусах исследуемых генотипов на 30-е сутки культивирования проводили сравнительную оценку содержания молекулярного маркера меристематических клеток пшеницы — пролиферативного антигена инициалей (ПАИ) (Евсеева Н.В. и др., 2007) [2] методом твердофазного иммуноферментного анализа. Для этого суммарные водорастворимые фракции каллусных белков, нормированные по концентрации суммарного белка, наносили по 50 мкл в каждую лунку полистиролового планшета («Медполимер», Санкт-Петербург). Свободные связи на полистироле блокировали 0,05%-ным раствором полиэтиленгликоля (мол. м. 20000). Антиген выявляли с помощью кроличьих моноспецифических антител к ПАИ и меченных пероксидазой козьих антикроличьих антител («Sigma», США). В качестве субстратного реагента использовали ортофенилендиамин с перекисью водорода. Интенсивность хромофорного ответа, прямо пропорциональную количеству ПАИ в образце, определяли с помощью иммуноферментного анализатора (Thermo, Finland) при длине волны света $\lambda=490$ нм.

Данные, полученные в ходе всех экспериментов, обрабатывали методом двухфакторного дисперсионного анализа с последующим сравнением частных средних по тесту Дункана с использованием пакета программ статистического и биометрико-генетического анализа в растениеводстве и селекции Agros версия 2.10. Варианты,

сопровожаемые одинаковыми латинскими буквами, достоверно различаются по тесту Дункана.

Результаты и обсуждение

В предварительных исследованиях было установлено, что короткостебельная почти изогенная линия пшеницы с геном Rht-B1c обладает более высоким морфогенным потенциалом в культуре соматических тканей *in vitro* по сравнению с ее высокорослым сестринским сибсом, несущим аллель дикого типа Rht-B1a (Евсеева Н.В. и др., 2007) [2].

Анализ каллусов на 30-е сутки культивирования показал, что активный процесс дедифференциации и пролиферации соматических клеток незрелых зародышей наблюдался во всех вариантах опыта. Эффективность каллусогенеза была высокой, близкой к 100%, и не зависела от генотипа или наличия дополнительных компонентов в питательной среде (табл. 1).

После 3 недель культивирования на каллусах наблюдалось появление очагов меристематической активности и зеленых зон регенерации (рис. 1). Установлено, что в контроле, в среднем за 3 года, частота формирования морфогенных каллусов составляла у обеих линий менее 20% от количества инокулированных эксплантов (см. табл. 1). Введение в состав среды ЛПС в целом повышало активность морфогенетических процессов. Несмотря на некоторое варьирование по годам, статистически достоверное превышение выхода каллусов с очагами меристематической активности отмечалось у короткостебельной линии, при добавлении ЛПС в питательную среду в любой концентрации (см. табл. 1). Обладающий меньшей морфогенетической компетентностью высокорослый аналог показал увеличение по сравнению с контролем выхода каллусов с зонами вторичной дифференциации в варианте с 1 и 10 мг/л ЛПС.

По данным некоторых авторов, косвенным показателем морфогенной активности каллусов может служить их масса (Соболева М.И., Логинов И.В., 2004) [7]. Результаты нашего исследования не выявили подобной закономерности. Сырая масса морфогенных и неморфогенных каллусов во всех вариантах опыта достоверно не различалась и не зависела ни от генотипа линий, ни от содержания ЛПС в питательной среде. Данный морфометрический показатель, согласно полученным нами данным, не коррелирует с пролиферативной или морфогенетической активностью соматических клеток в каллусной ткани.

Влияние ЛПС на морфогенез в культуре соматических тканей

Вариант среды	Генотип	Общий выход каллусов, % от эксплантов	Выход морфогенных каллусов, % от эксплантов	Выход регенерантов, % от эксплантов
Контроль	LRht-B1c	94,9	17,1 ab	10,9 d
	LRht-B1a	97,5	14,1 a	2,2 a
ЛПС 1 мкг/мл	LRht-B1c	98,0	26,5 bc	6,6 abcd
	LRht-B1a	94,1	26,7 bc	4,0 ab
ЛПС 10 мкг/мл	LRht-B1c	100,0	29,7 c	8,4 bcd
	LRht-B1a	100,0	24,6 bc	4,1 ab
ЛПС 100 мкг/мл	LRht-B1c	95,4	26,1 bc	10,8 cd
	LRht-B1a	100,0	20,3 abc	7,5 bcd
F _{факт.}		0,539	3,838*	5,185*
HCP ₀₅		–	8,6	4,3
F _{факт.} A		4,818*	1,649	3,096
HCP ₀₅ A		3,2	–	–
F _{факт.} B		0,736	4,421*	8,791*
HCP ₀₅ B		–	6,1	3,0
F _{факт.} AB		0,266	3,984*	2,274
HCP ₀₅ AB		–	8,6	–

Примечание: здесь и далее фактор А – генотип; фактор В – вариант среды

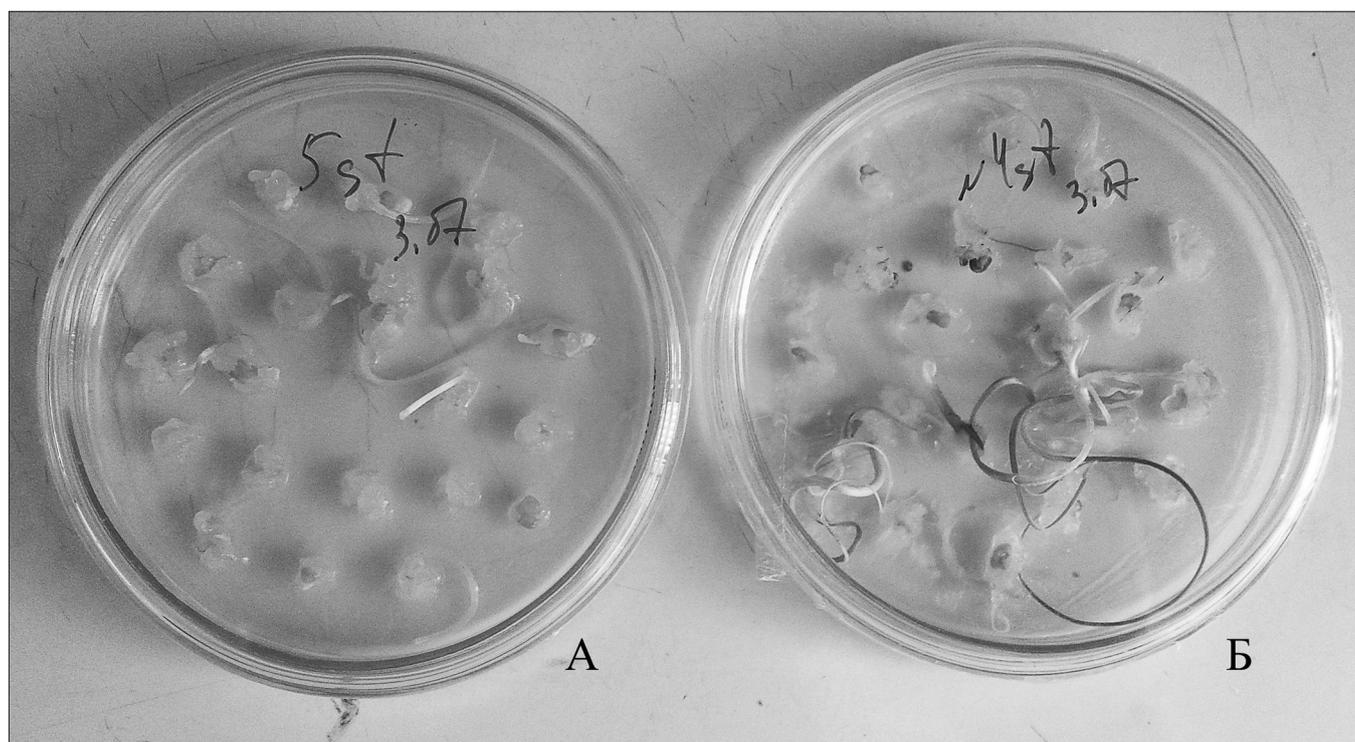


Рис. 1. Морфогенные каллусы на 30-е сутки культивирования у высокорослого сибса, несущего аллель Rht-B1a (А), и короткостебельной линии с аллелью Rht-B1c (Б)

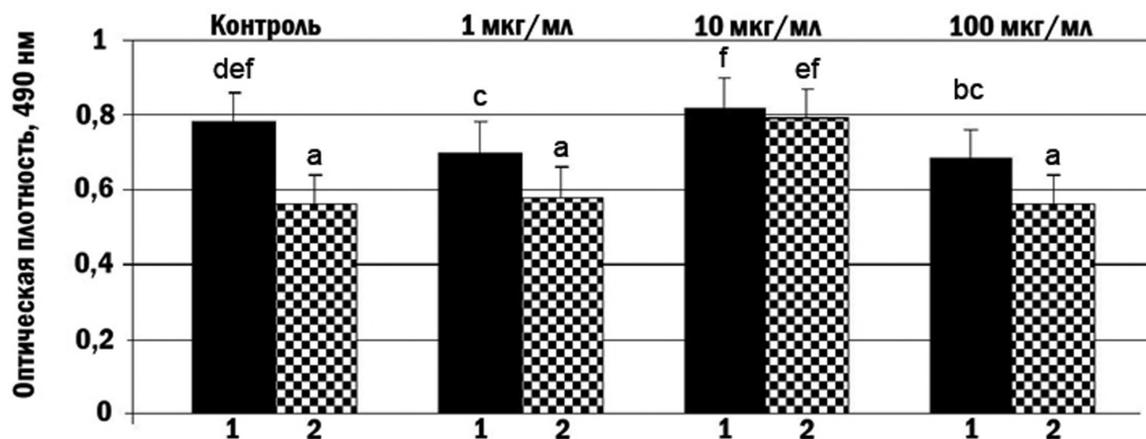


Рис. 2. Влияние ЛПС на сравнительное содержание ПАИ в каллусах на 30-е сутки культивирования. 1 – короткостебельная линия с аллелью Rht-B1c; 2 – высокорослая линия с аллелью Rht-B1a (сибс)

Таблица 2

Влияние ЛПС на морфологические параметры растений-регенерантов

Вариант среды	Генотип	Количество побегов на каллусе, шт.	Длина побега, см	Количество листьев, шт.	Длина корня, см	Количество корней, шт.	Масса побега с корнями, мг
Контроль	LRht-B1c	2,4	1,0a	2,2a	1,9	3,8	303,2ab
	LRht-B1a	2,3	4,9c	6,8bcd	1,0	7,0	349,5bc
ЛПС 1 мкг/мл	LRht-B1c	2,0	3,4abc	2,6a	1,5	5,0	231,3a
	LRht-B1a	2,5	4,8c	8,8d	1,4	5,2	291,0ab
ЛПС 10 мкг/мл	LRht-B1c	2,0	2,0ab	3,1a	0,9	4,6	363,2bc
	LRht-B1a	3,2	4,2bc	6,9cd	1,6	5,7	403,1c
ЛПС 100 мкг/мл	LRht-B1c	2,4	4,1bc	2,4a	1,3	4,2	321,2b
	LRht-B1a	2,2	4,2c	7,1cd	1,4	5,1	318,2b
F _{факт.}		0,883	3,965*	5,095*	1,722	1,840	5,111*
HCP ₀₅		—	2,2	3,5	—	—	76,5
F _{факт.} A		1,923	14,926*	23,524*	0,149	5,310*	4,886*
HCP ₀₅ A		—	1,3	2,0	—	1,3	44,2
F _{факт.} B		0,293	1,128	0,481	0,259	0,081	10,265*
HCP ₀₅ B		—	—	—	—	—	54,1
F _{факт.} AB		0,954	1,322	0,494	3,972*	1,864	0,070
HCP ₀₅ AB		—	—	—	0,8	—	—

Ранее было установлено, что содержание ПАИ в каллусах коррелирует с их эмбриогенной способностью [2]. Результаты настоящего исследования показали, что в контрольных вариантах без добавления ЛПС генотипы достоверно различаются между собой по содержанию ПАИ (рис. 2). В каллусах низкорослой линии, отличающейся повышенной по сравнению с сибсом способностью к формированию морфогенных каллусов, содержание ПАИ почти в 1,4 раза превышало его содержание в высокорослом сибсе. При добавлении в питательную среду ЛПС содержание ПАИ в каллусах высокорослого сибса увеличивалось и становилось практически равным его содержанию в каллусах низкорослой линии, обладающей высоким эмбриогенным потенциалом. Особенно ярко это проявилось при концентрации ЛПС в питательной среде 10 мг/л.

На выход растений-регенерантов большее влияние оказывал генотип экспланта (см. табл. 1). Короткостебельная линия характеризовалась более высокой регенерационной способностью по сравнению со своей сестринской линией, что проявлялось у контрольных растений. В опытных вариантах под влиянием ЛПС выход регенерантов у высокорослой линии увеличивался. Кроме того, регенеранты высокорослой линии отличались увеличением длины побега и количества листьев. Корневая система формировалась во всех вариантах с одинаковой интенсивностью, а масса побега варьировала без видимой закономерности (табл. 2).

Заключение

Установлено, что ЛПС ассоциативных бактерий *A. brasiliense* Sp245 стимулирует процессы вторичной дифференциации и регенерационную способность каллусных клеток пшеницы, повышая тем самым эффективность культивирования генотипов с низким морфогенным потенциалом. Наибольшей физиологической активностью в отношении каллусных клеток обладает ЛПС, присутствующий в среде культивирования в концентрации 10 мг/л. Полученные результаты могут быть использованы для повышения морфогенетической компетентности растительных объектов, в частности пшеницы, в культуре клеток и тканей *in vitro*.

Литература

1. Волкогон В.В., Димова С.Б., Мамчур А.Е. Особенности взаимоотношений бактерий рода *Azospirillum* с растениями картофеля, культивируемыми *in vitro* // Сельскохозяйственная микробиология. — 2006. — № 3. — С. 19–25.

2. Евсева Н.В., Ткаченко О.В., Лобачев Ю.В., Фадеева И.Ю., Щеголев С.Ю. Биохимическая оценка морфогенетического потенциала каллусных клеток в культуре *in vitro* пшеницы // Физиология растений. — 2007. — Т. 54. — № 2. — С. 306–311.
3. Ильчуков В.В. Культивирование каллусной ткани пшеницы с азотфиксирующими бактериями рода *Azospirillum* // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. — 2012. — № 6. — С. 28–29.
4. Каляева М.А., Захарченко Н.С., Доронина Н.В., Рукавцова Е.Б., Иванова Е.Г., Алексеева В.В., Троценко Ю.А., Бурьянов Я.И. Стимуляция роста и морфогенеза растений *in vitro* ассоциативными мезофильными бактериями // Физиология растений. — 2001. — Т. 48. — № 4. — С. 595–599.
5. Каляева М.А., Иванова Е.Г., Доронина Н.В., Захарченко Н.С., Троценко Ю.А., Бурьянов Я.И. Влияние аэробных мезофильных бактерий на морфогенез пшеницы мягкой (*Triticum aestivum*) *in vitro* // Физиология растений. — 2003. — Т. 50. — № 3. — С. 354–359.
6. Лобачев Ю.В. Проявление генов низкорослости у яровых пшениц в Нижнем Поволжье. — Саратов: Изд-во СГАУ, 2000. — 264 с.
7. Соболева М.И., Логинов И.В. Статистические характеристики, маркирующие морфогенез в каллусных культурах яровой мягкой пшеницы // Физиология растений. — 2004. — Т. 51. — № 2. — С. 287–296.
8. Федоненко Ю.П., Егоренкова И.В., Коннова С.А., Изнатов В.В. Участие липополисахаридов азоспирилл во взаимодействии с поверхностью корней пшеницы // Микробиология. — 2001. — Т. 70. — № 3. — С. 384–390.
9. Evseva N.V., Matora L. Yu., Burygin G.L., Dmitrienko V.V., Shchyogolev S.Yu. Effect of *Azospirillum brasiliense* Sp245 lipopolysaccharide on the functional activity of wheat root meristematic cells // J. Plant and Soil. — 2011. — Vol. 346. — P. 181–188.
10. He D.G., Tanner G., Scott K.J. Somatic embryogenesis and morphogenesis in callus derived from the epiblast of immature embryos of wheat (*Triticum aestivum*). // J. Plant Sci. — 1986. — Vol. 45. — P. 119–124.
11. Leive L., Shovlin V.K., Mergemhagen S.E. Physical, chemical and immunological properties of lipopolysaccharides released from *Escherichia coli* by ethylenediaminetetraacetate. // J Biol. Chem. — 1968. — Vol. 243. — P. 6384–6391.
12. Matora L., Solovova G., Serebrennikova O., Selivanov N., Shchyogolev S. Immunological properties of *Azospirillum* cell surface: the structure of carbohydrate antigens and evaluation of their involvement in bacteria-plant contact interaction / In: Fendrik I., del Gallo M., De Zamaroczy M., Vanderleyden J. (Eds.). *Azospirillum* VI and related microorganisms: genetics, physiology, ecology. — Springer, Berlin, 1995. — P. 377–382.

EFFECT OF LIPOPOLYSACCHARIDE *AZOSPIRILLUM BRASILIENSE* Sp245 ON MORPHOGENETIC POTENTIAL OF WHEAT CALLUS CELLS IN VITRO

O.V. TKACHENKO¹, N.V. EVSEEVA², Yu.V. LOBACHEV¹, L.Yu. MATORA², V.V. DMITRIENKO²,
G.L. BURYGIN², S.J. SHCHYOGOLEV²

¹ *N.I. Vavilov Saratov State Agrarian University;*

² *Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, RAS, Saratov, Russia*

We show that LPS associative bacteria *Azospirillum brasiliense* Sp245 stimulates secondary differentiation and regeneration capacity of wheat callus cells, increasing the efficiency of cultivation of genotypes with low embryogenic potential. Greatest physiological activity against callus cells has lipopolysaccharide present in the culture medium at a concentration of 10 µg ml⁻¹. The results can be used to enhance the morphogenetic competence of plant facilities, in particular wheat, in culture in vitro.

Keywords: callus, proliferative antigen initials, *Triticum aestivum* L., *Azospirillum brasiliense*, morphogenesis, in vitro.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ШТРИХ-КОДИРОВАНИЕ КАК ПОДХОД К ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛИЧНОСТИ НА ПРИМЕРЕ ПОПУЛЯЦИИ РУССКИХ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

Р.Р. ГАРАФУТДИНОВ*, О.В. ЧУБУКОВА, А.Р. САХАБУТДИНОВА,
В.А. ВАХИТОВ, А.В. ЧЕМЕРИС

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и генетики»
Уфимского научного центра РАН, Уфа*

ДНК-идентификация личности является одной из актуальных проблем человечества. Она осуществляется с помощью анализа повторяющихся элементов в геноме. В данной работе демонстрируется способ ДНК-идентификации личности с помощью генетического штрих-кодирования, основанного на однонуклеотидном полиморфизме ДНК. Для небольшой моноэтнической группы индивидов выявлены полиморфные нуклеотиды в 24 SNP и созданы генетические штрих-коды, сравнительный анализ которых показал, что каждый индивид имеет свой уникальный штрих-код.

Ключевые слова: ДНК-идентификация личности, однонуклеотидный полиморфизм, генетический штрих-код.

Введение

Одной из современных социально значимых задач является создание подхода к однозначной идентификации человека. Традиционные методы, наиболее надежным из которых считается дактилоскопия, имеют предел идентификационных возможностей. Нередки случаи, когда информацию о личности человека можно получить только из биологических следов, таких как кровь, волосы, другие ткани. Любой подобный биологический образец содержит ДНК, которая благодаря своему полиморфизму может обеспечить индивидуальность каждого человека.

Развитие молекулярной биологии дает возможность весьма успешно использовать методы ДНК-анализа для установления личности. Начало ДНК-идентификации было положено работами А. Джеффриса, впервые предложившего использовать высокополиморфные локусы для генетической паспортизации человека [5, 6]. В настоящее время на практике применяют по-

лиморфные локусы с повторяющимися единицами от 2 до 5 пн — STR (Short Tandem Repeats), которые позволяют анализировать фрагменты ДНК с точностью до одного нуклеотида, в том числе фрагментированную ДНК [4, 13]. В разных странах ДНК-генотипирование на основе STR-локусов осуществляется с использованием различных систем, в которых оцениваются как одинаковые, так и совсем отличающиеся нуклеотидные последовательности [1, 11].

Применение STR-локусов для ДНК-идентификации личности имеет серьезные недостатки, главным из которых является их зависимость от расовых и национальных особенностей индивида [10] и невозможность получения цифровых данных о ДНК-полиморфизме. Поэтому в последние годы в качестве маркерных локусов активно используется еще один тип полиморфизма ДНК — однонуклеотидные замены (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) [3]. В отличие от STR-локусов, SNP характеризуются более стабильным наследованием, меньшей подверженностью мутациям, возможностью анализа сильно фрагментированной ДНК [2, 8]. В связи с этим существует необходимость в разработке подходов, позволяющих создать универсальную систему ДНК-идентификации личности на основе цифровых данных по полиморфизму ДНК.

Целью данной работы стала демонстрация подхода к ДНК-идентификации личности с помощью генетических штрих-кодов (ГШК) на основе тетрааллельных SNP на примере небольшой группы индивидов русской

© 2012 г. Гарафутдинов Р.Р., Чубукова О.В., Сахабутдинова А.Р., Вахитов В.А., Чемерис А.В.

* **Автор для переписки:**

Гарафутдинов Равиль Ринатович
к.б.н., зав. лабораторией

Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН,
450054 Уфа, просп. Октября, 71

Тел./факс: +7 (347) 235-60-88

E-mail: garafutdinovr@mail.ru

этнической принадлежности, проживающих в Республике Башкортостан.

Материалы и методы

В исследование был включен 21 человек, русских по этнической принадлежности, неродственных между собой (жителей Республики Башкортостан). Материалом для исследования служили образцы ДНК, полученные из цельной венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции [12].

SNP анализировали с помощью метода аллель-специфичной ПЦР в реальном времени с использованием эффекта дискриминации 3'-концевого нуклеотида с четырьмя аллель-специфичными праймерами, в которые были введены дополнительные некоплементарные нуклеотиды [9]. ПЦР проводили в амплификаторе iQ5 (BioRad, США) с применением для детекции ампликонов интеркалирующего красителя Eva Green.

Праймеры подбирали с помощью компьютерной программы PrimerSelect пакета программ Lasergene (DNASTAR Inc., США), а также в режиме on-line с использованием OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, США).

Смесь для амплификации объемом 30 мкл включала в себя 10 пмоль каждого праймера, 67 мМ Трис-НСl (рН 8,8), 2,5 мМ MgCl₂, 0,001% Твин-20, 200 мкМ каждого из dNTP, 2,5 ед. Taq-полимеразы, 1× раствор Eva Green. ПЦР проводили по программе: 94,0 °С – 2 мин., далее 45 циклов: 94,0 °С – 15 с, отжиг в диапазоне 50,0–60,0 °С – 30 с, 72,0 °С – 30 с. В качестве контроля для каждого SNP анализировали продукты амплификации в 10%-ном полиакриламидном геле в 1× TAE с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в ультрафиолетовом свете, а также проводили плавление ампликонов.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программного обе-

спечения MS Excel 98 (Microsoft) и пакета программ «Statistica for Windows 6.0» (StatSoft).

Результаты и обсуждение

Мы предлагаем новый принцип ДНК-идентификации личности, заключающийся в создании для каждого человека генетического штрих-кода на основе информации о SNP-полиморфизме. Считаем, что для этой цели необходимо использовать генетически не сцепленные между собой тетрааллельные SNP из некодирующих участков генома, расположенные в разных аутосомах. Данные SNP не должны нести информацию об этнической и расовой принадлежности человека. Количество тетрааллельных снипов для создания генетического штрих-кода должно составить не менее 24. Для идеальных снипов с максимальным полиморфизмом это позволит обеспечить септиллион (10²⁴) комбинаций, что на 14 порядков превышает все нынешнее население Земли.

Нами предлагается отличный от существующего способ оцифровки нуклеотидов в снипах, согласно которому цифровой код присваивается условной ячейке снипа. Наличие того или иного нуклеотида обозначается «1» и в графическом виде отображается черной зоной в ячейке, отсутствие – «0» и соответственно белой зоной (табл. 1). Возможны 10 комбинаций нуклеотидов в снипах: 4 гомозиготных и 6 гетерозиготных состояний, кодирующихся следующим образом: А и А – 1000, С и С – 0100, G и G – 0010, Т и Т – 0001, А и С – 1100, А и G – 1010, А и Т – 1001, С и G – 0110, С и Т – 0101, G и Т – 0011.

ГШК можно изобразить в бинарном формате в виде сплошной линейной записи перемежающихся «нулей» и «единиц», где последние соответствуют местам присутствующих полиморфных нуклеотидов в снипах. Бинарный формат можно легко преобразовать в более компактный графический.

Таблица 1

Ячейки снипов с возможными комбинациями полиморфных нуклеотидов в них и их бинарное кодирование

А и А	С и С	G и G	Т и Т	А и С	А и G	А и Т	С и G	С и Т	G и Т
1000	0100	0010	0001	1100	1010	1001	0110	0101	0011

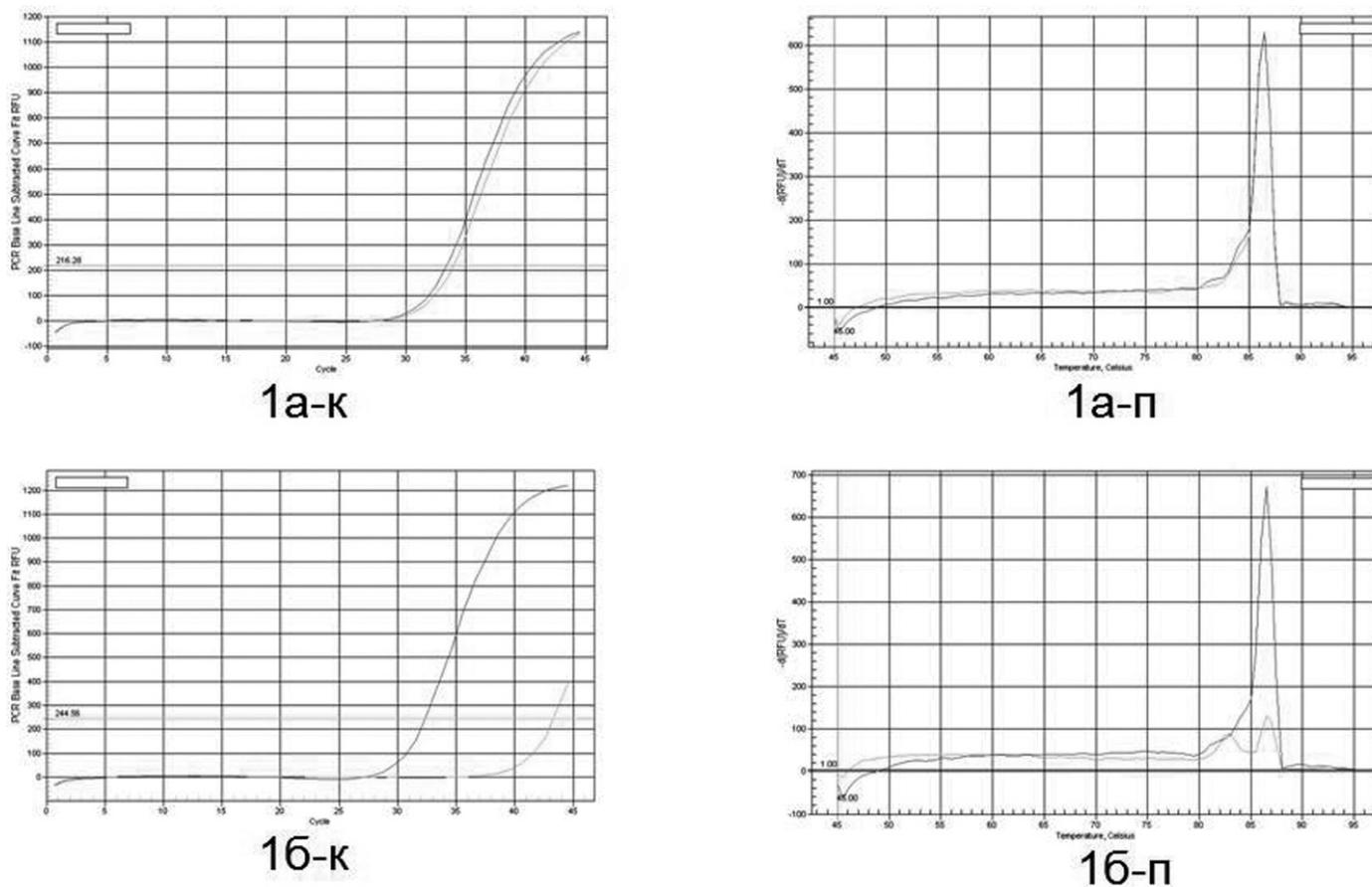


Рис. 1. Генотипирование ДНК двух индивидов с помощью аллель-специфичной ПЦР в реальном времени по rs2296781: вариант 1 – индивид А, гетерозигота, вариант 2 – индивид Б, гомозигота; а – кривые накопления флуоресценции, б – профили плавления

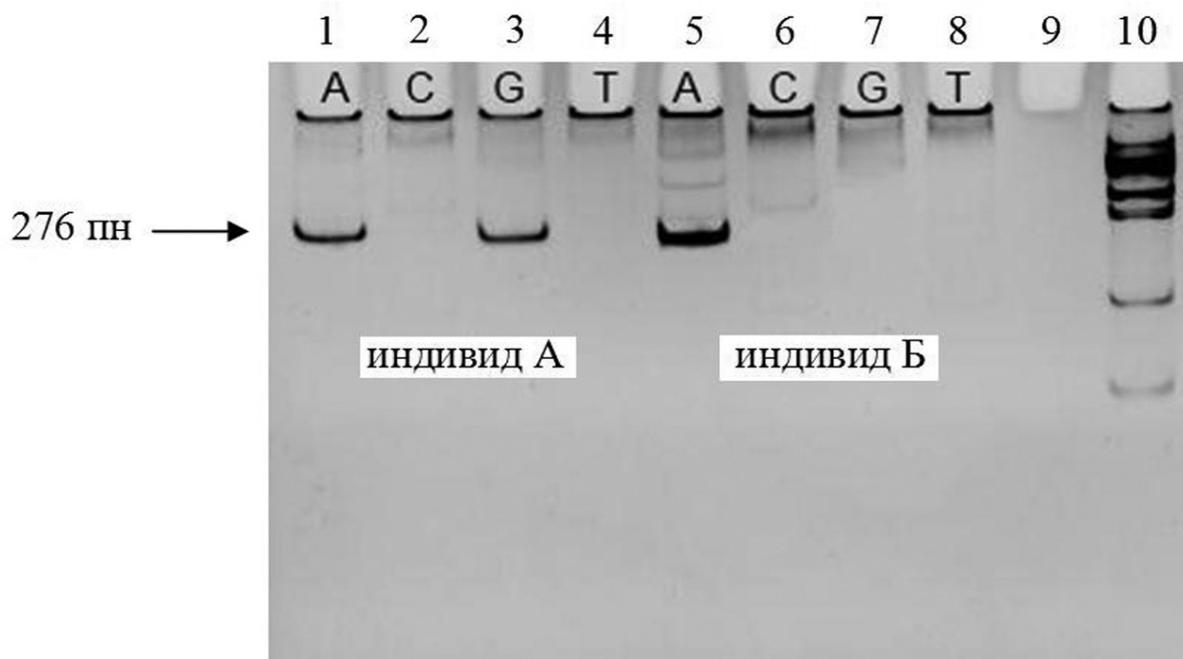


Рис. 2. Электрофореграмма результатов аллель-специфичной ПЦР для ДНК двух индивидов (rs2296781). Дорожки 1, 2, 3, 4 – ДНК индивида А, гетерозигота АС. Дорожки 5, 6, 7, 8 – ДНК индивида Б, гомозигота АА. Дорожка 9 – отрицательный контроль. Дорожка 10 – маркер

Поиск конкретных тетрааллельных снипов, применимых для генетического штрих-кодирования человека, был осуществлен с использованием базы данных SNP ресурса PubMed (dbSNP) согласно следующим критериям: organism – Homo sapiens; chromosome – 1-22; function class – intron; SNP class – snp; method class – sequence; variation allele – N; validation status – MapMap и 1000 genome; map weight – 1. В соответствии с данными критериями на момент поиска было обнаружено более 500 снипов. Поскольку дальнейшее генотипирование проводилось с помощью аллель-специфической ПЦР, среди множества найденных SNP отбирались «удобные» в отношении подбора праймеров последовательности. Для достижения заданного количества анализируемых снипов (24 SNP) было подобрано 53 комплекта праймеров (по 5 олигонуклеотидов: 4 – аллель-специфичных и 1 обратный).

Генотипирование каждого индивида из моноэтнической выборки осуществлялось по каждому из 24 SNP, составляющих панель для генетического штрих-

кодирования с помощью аллель-специфичной ПЦР в реальном времени. При этом о генотипе судили по кривым накопления флуоресценции и профилям плавления ампликонов (рис. 1). Для гетерозиготного варианта (рис. 1а-к) накопление флуоресцентного сигнала равномерно для обеих аллелей, и пики плавления продуктов реакции (ампликонов) совпадают (рис. 1а-п). В случае гомозиготы (рис. 1б-к и 1б-п) наблюдается иная картина. В качестве дополнительного контроля для каждого SNP анализировали продукты амплификации с помощью гель-электрофореза (рис. 2). Статистическая оценка частот генотипов и аллелей SNP, использованных для генетического штрих-кодирования, представлена в таблице 2. Для всех снипов частоты генотипов и аллелей удовлетворительно коррелировали со значениями, представленными в базе SNP ресурса PubMed для лиц европеоидной группы. В данной работе детальный сравнительный анализ указанных параметров не проводился ввиду малого размера исследуемой выборки.

Таблица 2

Распределение частот аллелей и генотипов SNP, использованных для генетического штрих-кодирования.

Объем выборки N=21, p_i – численность группы, p_i – частота генотипа (аллеля),

sp – статистическая ошибка

SNP	Аллели	$p_i \pm sp, \% (n_i)$	Генотипы	$p_i \pm sp, \%$
rs 2312154	A	40,48±7,57(17)	AA	19,05±8,56 (4)
	G	59,52±7,57 (25)	AG	42,86±10,80 (9)
			GG	38,10±10,60 (8)
rs11810820	A	95,24±3,29 (40)	AA	90,48±6,4 (19)
	C	4,76±3,29 (2)	AC	9,52±6,4 (2)
			CC	0 (0)
rs6751599	A	33,33±7,27 (14)	AA	14,29±7,64 (3)
	G	66,67±7,27(28)	AG	38,10±10,59 (8)
			GG	47,61±10,89 (10)
rs9756835	A	11,91±5,00 (5)	AA	0 (0)
	G	88,09±5,00 (37)	AG	23,81±9,29 (5)
			GG	76,19±9,29 (16)
rs79965716	G	83,33±5,75 (35)	GG	71,43±9,85 (15)
	T	16,67±5,75(7)	GT	23,81±9,29 (5)
			TT	4,76±4,64 (1)
rs41338750	A	78,57±6,33 (33)	AA	61,91±10,59 (13)
	G	21,43±6,33(9)	AG	33,33±10,29 (7)
			GG	4,76±4,65 (1)
rs1141538	A	42,86±7,64 (18)	AA	14,29±7,64 (3)
	G	57,14±7,64 (24)	AG	57,14±10,80 (12)
			GG	28,57±9,85 (6)
rs116503776	A	7,13±3,97 (3)	AA	0 (0)
	G	92,87±3,97 (39)	AG	14,29±7,64 (3)
			GG	85,71±7,64 (18)

Таблица 2 (Продолжение)

SNP	Алели	$\rho_i \pm s_p, \% (n_i)$	Генотипы	$\rho_i \pm s_p, \%$
rs642761	C	9,52±4,52 (4)	CC	19,05±8,57
	T	90,48±4,52 (38)	CT	80,95±8,57
			TT	0 (0)
rs79760154	A	100 (42)	AA	100 (21)
	C	0 (0)	AC	0 (0)
			CC	0 (0)
rs2296781	A	50,00±5,46 (21)	AA	19,05±8,57 (4)
	G	50,00±5,46 (21)	AG	61,90±10,60 (13)
			GG	19,05±8,57 (4)
rs 9420407	C	73,81±6,78 (31)	CC	52,38±10,90 (11)
	T	26,19±6,78 (11)	CT	42,86±10,80 (9)
			TT	4,76±4,65 (1)
rs1148097	A	16,67±5,75 (7)	AA	0 (0)
	G	83,33±5,75 (35)	AG	33,33±10,29 (7)
			GG	66,67±10,29 (14)
rs1131476	A	71,43±6,97 (30)	AA	42,86±10,80 (9)
	G	28,57±6,97(12)	AG	57,14±10,80 (12)
			GG	0 (0)
rs9518075	A	78,57±6,33 (33)	AA	57,14±10,80 (12)
	C	21,43±6,33 (9)	AC	42,86±10,80 (9)
			CC	0 (0)
rs2268336	C	35,71±7,40 (15)	CC	9,52±6,40 (2)
	T	64,29±7,40 (27)	CT	52,38±10,90 (11)
			TT	38,10±10,60 (8)
rs2305646	G	0 (0)	GG	0 (0)
	T	100 (42)	GT	0 (0)
			TT	100 (21)
rs2241148	A	85,71±7,64 (36)	AA	71,43±9,86 (15)
	G	14,29±7,64 (6)	AG	28,57±9,86 (6)
			GG	0 (0)
rs37858843	C	97,61±2,36 (41)	CC	95,24±4,65 (20)
	T	2,39±2,36 (1)	CT	4,76±4,65 (1)
			TT	0 (0)
rs1080094	A	73,81±6,78 (3)	AA	52,38±10,90 (11)
	G	26,19±6,78 (11)	AG	42,86±10,80 (9)
			GG	4,76±4,65 (1)
rs3786614	C	54,76±7,68 (23)	CC	9,52±6,40 (2)
	T	45,24±7,68 (19)	CT	90,48±6,40 (19)
			TT	0 (0)
rs28482886	A	90,48±4,53 (38)	AA	80,95±8,60 (17)
	C	9,52±4,53 (4)	AC	19,05±8,60 (4)
			CC	0 (0)
rs1005173	A	83,33±5,75 (35)	AA	66,67±10,29 (14)
	G	16,67±5,75 (7)	AG	33,33±10,29 (7)
			GG	0 (0)
rs2267185	A	0 (0)	AA	0 (0)
	G	0 (0)	AG	0 (0)
		100 (42)	GG	100 (21)

Обработку информации о полиморфных нуклеотидах в SNP и генерацию ГШК осуществляли с помощью написанной нами ранее компьютерной программы «CodeGEN». На рисунке 3 в качестве иллюстрации приведены ГШК в графическом виде лишь для трех индивидов. Сравнительный анализ всех ГШК показал, что каждый индивид имеет свой уникальный штрих-код, то есть ни один ГШК не повторяет другой. Однако не исключено, что с увеличением выборки подобранная панель из 24 SNP может не обеспечить уникальность ГШК, и в этом случае нужно будет расширить SNP-панель, например, до 48 снипов.

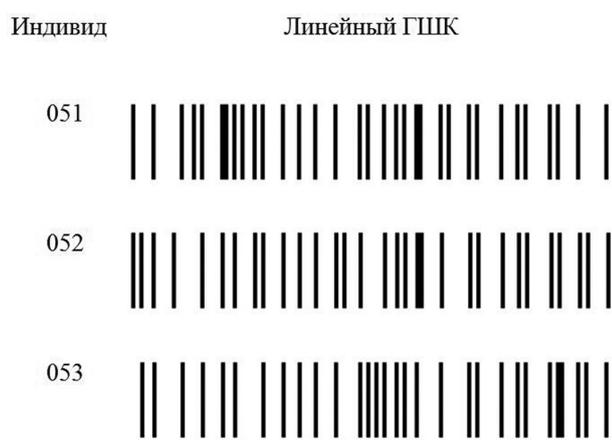


Рис. 3. Графические ГШК для трех проанализированных индивидов

Заключение

Предлагаемый подход к ДНК-идентификации личности подразумевает подбор адекватной, достаточной панели SNP, обеспечивающей уникальность набора полиморфных нуклеотидов, их оцифровку и последующую генерацию генетических штрих-кодов. Генотипирование может быть реализовано с помощью совершенно разных методов, причем полученные данные будут полностью сопоставимы и могут быть оцифрованы. ГШК как идентификатор личности может использоваться наряду с общепринятыми документами: паспортом, водительскими правами, другими документами и/или быть совмещенным с ними. Считаем, что ГШК должен быть основан на нейтральных сведениях о полиморфизме ДНК и не содержать информацию личного характера.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (Государственные контракты № № 14.740.11.1059, 16.518.11.7047, Соглашение № 8046).

Литература

1. *Andreassen R., Pereira L., Dupuy B.M., Mevaag B.* Icelandic population data for the STR loci in the AMPFSTR SGM Plus system and the PowerPlex Y-system // *Forensic Sci. Int. Genet.* — 2010. — Vol. 4(4). — P. e101–103.
2. *Asari M., Watanabe S., Matsubara K. et al.* Single nucleotide polymorphism genotyping by mini-primer allele-specific amplification with universal reporter primers for identification of degraded DNA // *Anal. Bioch.* — 2009. — Vol. 386. — P. 85–90.
3. *Borsting O., Tomas C., Morling N.* Typing of 49 autosomal SNPs by single base extension and capillary electrophoresis for forensic genetic testing // *Methods Mol. Biol.* — 2012. — Vol. 830. — P. 87–107.
4. *Edwards A., Civitello A., Hammond H.A., Caskey C.T.* DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats // *Am. J. Hum. Genet.* — 1991. — Vol. 49. — P. 746–756.
5. *Gill P., Jeffreys A.J., Werrett D.J.* Forensic application of DNA «fingerprints» // *Nature.* — 1985. — Vol. 318. — P. 577–579.
6. *Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L.* Hypervariable minisatellite region in human DNA // *Nature.* — 1985. — Vol. 314. — P. 67–73.
7. *Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L.* Individual specific «fingerprints» of human DNA // *Nature.* — 1985. — Vol. 316. — P. 76–79.
8. *Morling N.* Forensic genetics // *Lancet.* — 2004. — Vol. 364. — P. 10–11.
9. *Patrushev L.I., Zytkova E.S., Kayushin A.L. et al.* New DNA diagnostic system for detection of Factor V Leiden // *Thrombosis Res.* — 1998. — Vol. 32. — P. 251–259.
10. *Pereira L., Alshamali F., Andreassen R. et al.* PopAffiliator: online calculator for individual affiliation to a major population group based on 17 autosomal short tandem repeat genotype profile // *Int. J. Legal. Med.* — 2011. — Vol. 125. — P. 629–636.
11. *Planz J., Sannes-Lowery K., Duncan D. et al.* Automated analysis of sequence polymorphism in STR alleles by PCR and direct electrospray ionization mass spectrometry // *Forensic Sci. Int. Genet.* — 2012. — Vol. 6. — P. 594–606.
12. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* *Molecular cloning: A Laboratory Manual.* — N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. — 479 p.
13. *Weiler N., Matai A., Sijen T.* Extended PCR conditions to reduce drop-out frequencies in low template STR typing including unequal mixtures // *Forensic Sci. Int. Genet.* — 2012. — Vol. 6. — P. 102–107.

Список сокращений

ГШК — генетический штрих-код,

SNP — single nucleotide polymorphism, однонуклеотидный полиморфизм,

ПЦР — полимеразная цепная реакция.

GENETIC BARCODING APPROACH AS TO THE IDENTIFICATION OF THE PERSON ON THE EXAMPLE OF RUSSIANS OF THE REPUBLIC OF BASHKORTOSTAN

R.R. GARAFUTDINOV, O.V. CHUBUKOVA, A.R. SAHABUTDINOVA,
V.A. VAKHITOV, A.V. CHEMERIS

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, RAS, Ufa, Russia

DNA identification of individual is one of the urgent problems of humanity. It is carried out by analysis of repetitive elements in the genome. This paper demonstrates how to realize DNA identification by genetic barcoding, based on single nucleotide polymorphism DNA. For a small mono-ethnic group of individuals identified polymorphic nucleotides in the 24 SNP and created genetic bar codes, a comparative analysis which shows that each individual has a unique bar code.

Keywords: DNA identification of individual, single nucleotide polymorphism, genetic bar code.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ БАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS AUREOFACIENS* ПРИ ХРАНЕНИИ

Ю.А. БУРОВА*, С.А. ИБРАГИМОВА, В.В. РЕВИН

Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева, Саранск

Изучена динамика изменения содержания индолил-3-уксусной кислоты и состава антибиотиков феназинового ряда (феназин-1-карбоновая кислота, 2-гидроксифеназин-1-карбоновая кислота, 2-гидроксифеназин) в культуральной жидкости бактерии *Pseudomonas aureofaciens* в процессе хранения. Выявлены протео- и хитинолитические свойства культуральной жидкости.

Ключевые слова: бактерии, *Pseudomonas aureofaciens*, культуральная жидкость, фитогормоны, семена, ферменты, антибиотики.

Введение

Для биологической защиты растений от бактериальных и грибных болезней, а также для управления биоценозами почв стали использовать штаммы природных микроорганизмов, выделенных из различных видов почвы, в качестве биостимулирующих агентов, продлевая тем самым допестицидный период выращивания растений [10, 13]. К таким микроорганизмам чаще всего относятся бактерии родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, грибы родов *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Fusarium* [1].

Особый интерес представляют флуоресцирующие псевдомонады, синтезирующие целый ряд соединений, оказывающих ростостимулирующее действие на растения, либо угнетающих развитие фитопатогенных грибов [16]. Стимуляторы роста растений представлены у бактерии данного вида фитогормонами (индолил-3-уксусная кислота (ИУК) и цитокинины, гибберелины) [15, 17]. Использование природных фитогормонов микробного происхождения в растениеводстве весьма перспективно ввиду простоты их получения, сравнительной дешевизны, высокой способности их к детоксикации в растительном

организме, а также способности легко связываться в клетке и катаболизироваться. Антифунгальный эффект ризосферных микроорганизмов обусловлен синтезом антибиотических веществ. У бактерий *Pseudomonas* обнаружено около 100 антибиотических веществ самого разнообразного строения и только не более 20% из них играют роль в подавлении фитопатогенных грибов при незначительных концентрациях [6, 12, 14]. Наиболее хорошо изучены феназин-1-карбоновая кислота, феназин-1-карбоксамид, 2,4-диацетилфлороглюцин, пиoluteорин, пирролнитрин и цианид водорода.

Анализ литературных источников свидетельствует о различной способности микроорганизмов к продукции активных метаболитов, зависящей от вида, штамма, среды и условий культивирования. Поиск и изучение новых штаммов ризосферных микроорганизмов позволят расширить спектр используемых на рынке биопрепаратов.

Целью данной работы явилось изучение активных метаболитов в культуральной жидкости бактерии *Pseudomonas aureofaciens* штамм 2006, выращенной на меласной среде в процессе хранения.

Материалы и методы

На биологическом факультете Мордовского государственного университета имени Н.П. Огарева ведутся исследования по созданию биопрепарата для защиты и стимуляции роста растений на основе нового штамма бактерии *Pseudomonas aureofaciens*, выделенной из почвы и отселекционированной сотрудниками кафедры биотехнологии.

© 2012 г. Бурова Ю.А., Ибрагимова С.А., Ревин В.В.

* **Автор для переписки:**

Бурова Юлия Александровна,
аспирант кафедры биотехнологии, биологического факультета
Мордовского государственного университета имени Н.П. Огарева
430032 Саранск, ул. Ульянова, 26 б
Тел./факс: +7 (8342)324554
E-mail: burova13@gmail.com

Объектом исследования явился новый штамм бактерии *Pseudomonas aureofaciens*. Данная культура обладает антифунгальными свойствами и ростостимулирующим действием на растения (Булова Ю.А. с соавт., 2012) [2]. Культивирование бактерии осуществляли на меласной среде оптимизированного состава в био-реакторе Sartorius A plus (Германия) при 180 об./мин. в течение 3 суток. Хранение бактериальной суспензии (БС) осуществляли при 4 °С в течение 30 суток. Каждые сутки контролировали уровень продукции фитогормона — индоллил-3-уксусной кислоты колориметрическим методом (Gordon S.A. and Weber R.P., 1951) [11]. Клетки осаждали центрифугированием при 14000 об./мин. 5 минут. К 1 объему супернатанта добавляли 0,5 объема реактива Сальковского (0,05 М FeCl₃ в 35%-ном растворе хлорной кислоты). Оптическую плотность определяли через 1 час при длине волны 540 нм на спектрофотометре Shimadzu (Япония). Определение уровня ИУК в супернатанте проводили с помощью калибровочной кривой, построенной с использованием раствора синтетической ИУК. Для определения ростостимулирующего эффекта полученным супернатантом культуральной жидкости (КЖ) обрабатывали семена пшеницы сорта «Тулайковская 10». Для этого семена в количестве 100 штук погружали в раствор супернатанта, разведенного водой в соотношении 1:100, и помещали на чашки Петри. На 3- и 7-е сутки определяли энергию прорастания и всхожесть согласно ГОСТ 12038-84 «Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести» [5]. Семена инкубировали в климатической камере Sanuo MLR-351 H (Japan) при константных условиях.

КЖ бактерий исследовали на наличие в ней веществ феназиновой природы. Разделение данных пигментов проводили методом препаративной тонкослойной хроматографии (Власова Е.П., 2011) [4] на 3-, 5-, 10- и 14-е сутки хранения бактериальной суспензии. Пигменты экстрагировали хлороформом, разделение осуществляли с использованием пластинок «Силуфол» 20x20 см (Чехия) в системе хлороформ : метанол : 25% водный раствор аммиака (90:25:1). Окрашенные соединения анализировали по хроматографической подвижности R_f.

Для выявления протеолитических ферментов в супернатанте КЖ бактерии использовали молочный агар Эйкмана. Засеянные чашки Петри инкубировали в термостате при 28–30 °С в течение 8–10 суток. Гидролиз казеина обнаруживали по зоне просветления среды вокруг супернатанта (Позднякова Л.И., 1981) [8].

При исследовании хитинолитических ферментов супернатант КЖ в количестве 0,1 мл засеивали на среду

с коллоидным хитином по центру чашки. Термостатирование проводили при 28 °С. На 6- и 12-е сутки роста поверхность среды обрабатывали красителем Конго красным (0,1%). О наличии хитиназы судили по зоне просветления, образующейся в результате ферментативного разложения хитина (Быкова В.М. с соавт., 2002) [3].

Результаты и обсуждение

Как видно из данных, представленных на рисунке 1, в процессе хранения БС наблюдаются существенные изменения уровня ИУК. Кривая накопления фитогормона характеризовалась наличием двух пиков. Первый максимум отмечен на 12-е сутки хранения БС, второй — на 19-е сутки (0,38 мкг/мл). Оба максимума имели равные значения и были непродолжительными во времени. Определение титра в культуральной жидкости на данный период показало наличие большого количества колоний бактерии (10⁹ КОЕ/мл). При увеличении сроков хранения наблюдалось снижение концентрации ИУК в среднем на 54%. С 22-х по 30-е сутки хранения БС уровень ИУК оставался на постоянном уровне.

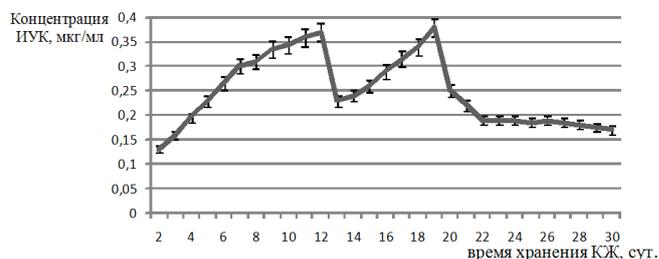


Рис. 1. Динамика содержания ИУК в супернатанте *Pseudomonas aureofaciens* 2006 в процессе хранения

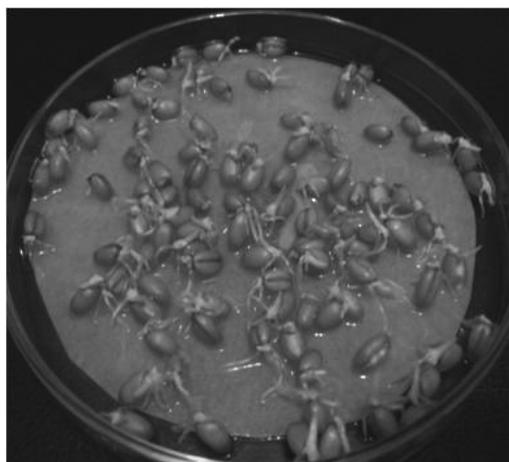
Способность ряда бактерий к синтезу ИУК в фазе замедления роста установлена ранее (Олюнина Л.Н., Шабаев В.П., 1996) [7]. В данном случае причина наличия двух пиков может быть связана с замедлением роста бактерии, обусловленного температурным стрессом при хранении, а также лимитирование питательных субстратов. На наш взгляд, выделение ИУК бактериями в неблагоприятных условиях может иметь большое значение для сохранения ростостимулирующих свойств БС, что позволит использовать ее для обработки семян растений в течение длительного периода хранения.

Для подтверждения вышесказанного исследовалось влияние супернатанта БС (после 12 суток хранения) на ростовые показатели семян пшеницы. Как видно из данных, представленных в таблице 1 и на рисунке 2, значения энергии прорастания в опытных вариантах

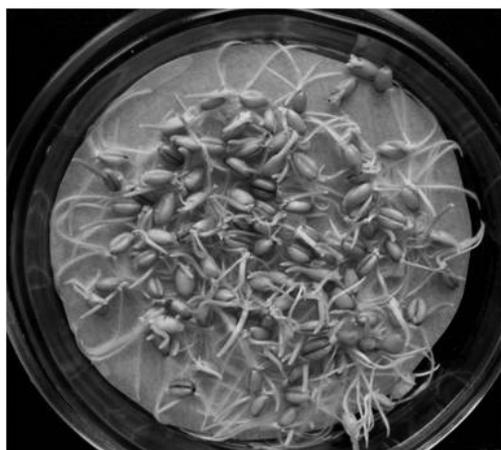
превышали контрольные значения в среднем на 15%, а всхожесть — на 14%. При этом отмечено лучшее развитие ростков и корневой системы у опытных семян.

Таблица 1
Ростовые показатели семян пшеницы сорта «Тулайковская 10»

Варианты обработки семян	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	Высота ростков, см
Контроль	80±3	83±2	5,5±1,2
Супернатант	95±1	97±3	9,5±2,0
Культуральная жидкость <i>Ps. aureofaciens</i>	96±2	96±3	11,0±1,7



контроль



супернатант

Рис. 2. Вид семян пшеницы (3-и сутки прорастания)

Следовательно, ростостимулирующий эффект исследуемой суспензии при отделении клеток сохраняется.

По нашему мнению, это обусловлено наличием активных метаболитов в КЖ, в частности ИУК. Ранее было показано положительное влияние бактерий *Pseudomonas fluorescens* AP-33, *Pseudomonas aureofaciens* BS 1393 на развитие растений картофеля, пшеницы, овса (Саламатова Ю.А. с соавт., 2010) [9].

Основная роль в микопаразитическом эффекте псевдомонад отводится веществам антибиотической природы (Логинов О.Н., 2004) [6]. Для подтверждения антагонистических свойств оценивалась способность исследуемой культуры к образованию антибиотических веществ, используя метод тонкослойной хроматографии.

Полученные результаты продемонстрировали, что на 3-е сутки хранения в КЖ обнаруживается антибиотик феназинового ряда — 2-гидроксифеназин-1-карбоновая кислота (Rf 30); с увеличением сроков хранения число антибиотических веществ увеличивается. Так, на 5-е сутки дополнительно обнаружена феназин-1-карбоновая кислота. На 10-е сутки хранения выявлен только 2-гидроксифеназин, но уже на 14-е сутки — все три антибиотических вещества (табл. 2).

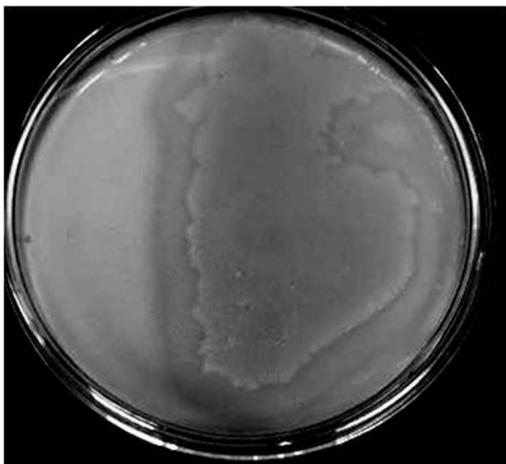
Таким образом, в процессе хранения БС *Pseudomonas aureofaciens* (штамм 2006) отмечено наличие антибиотиков феназинового ряда, состав которых не постоянен, что, возможно, связано с их взаимным превращением друг в друга.

Таблица 2
Хроматографическая подвижность феназиновых пигментов

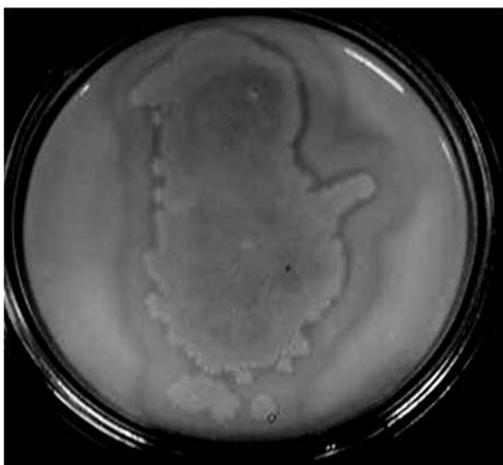
Время хранения БС, сутки	Rf×100	Структура
3	30	2-гидроксифеназин-1-карбоновая кислота
5	15 30	Феназин-1-карбоновая кислота 2-гидроксифеназин-1-карбоновая кислота
10	51	2-гидроксифеназин
14	14 28 46	Феназин-1-карбоновая кислота 2-гидроксифеназин-1-карбоновая кислота 2-гидроксифеназин

Антагонизм микроорганизмов по отношению к грибам проявляется в лизисе мицелия за счет действия гидролитических ферментов (Логинов О.Н., 2004 [6]; Naas

D. and Defago G., 2005 [12]). Ориентировочную оценку наличия хитиназ и протеаз в супернатанте исследуемой БС проводили, используя соответствующие агаризованные среды. При исследовании протеолитических свойств 10- и 20-суточной КЖ отмечены практически равные зоны гидролиза казеина (в среднем $2 \pm 0,2$ см) (рис. 3).



а

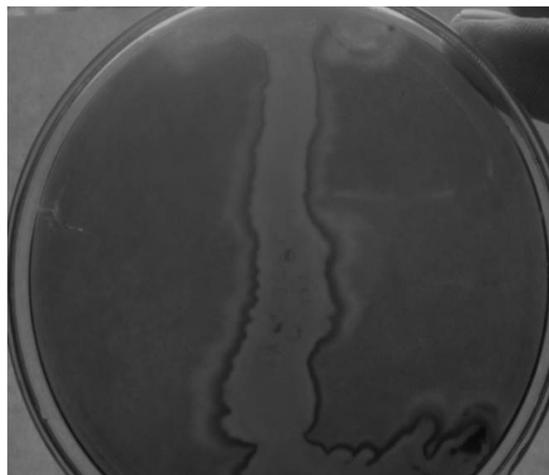


б

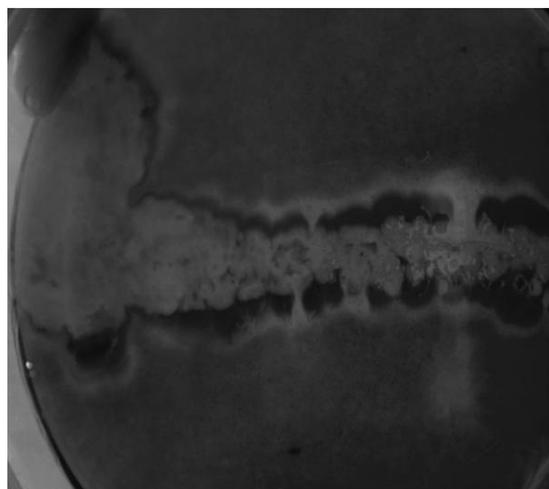
Рис. 3. Зона гидролиза казеина. а – 10-суточная КЖ; б – 20-суточная КЖ

Из полученных данных следует, что в КЖ присутствуют протеолитические ферменты, действие которых в процессе хранения сохраняется.

Концевые участки грибных гиф чувствительны к действию бактериальных хитиназ, так как именно в данных частях мицелия происходит синтез волокон хитина (Позднякова Л.И., 1981) [8]. При исследовании супернатанта была отмечена способность к гидролизу коллоидного хитина как на ранних, так и на более поздних сроках хранения БС (рис. 4). При продолжительном воздействии на субстрат степень гидролиза увеличивается. Так, на 7-е сутки термостатирования зона гидролиза в 2 раза ниже, чем через 12 суток.



а



б

Рис. 4. Зона гидролиза хитина. а – супернатант 5-суточной КЖ; б – супернатант 20-суточной КЖ

Заключение

На основании проведенных исследований по определению биологически активных веществ в культуральной жидкости нового штамма бактерии *Pseudomonas aureofaciens* можно заключить:

- В процессе хранения бактериальной суспензии, полученной на меласной среде, выделение ИУК культурой происходит непостоянно. При отделении клеток бактерии от культуральной жидкости ростостимулирующий эффект сохраняется.
- Состав антибиотических веществ в культуральной жидкости изменяется в процессе хранения суспензии бактерии. Максимальное количество приходится на более поздние сроки хранения.
- При отделении бактериальных клеток от культуральной жидкости показана способность супернатанта к гидролизу казеина и хитина.

Таким образом, исследуемый нами штамм *Pseudomonas aureofaciens* способен активно синтезировать антибиотические вещества, которые сохраняются в культуральной жидкости бактерии в течение длительного времени и поэтому могут использоваться для обработки растений без потери ростостимулирующего и антифунгального эффектов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программе «СТАРТ 2011» (госконтракт № 9318р/15161).

Литература

1. Алимова Ф.К. Trichoderma/Нурореа (Fungi, Ascomycetes, Нурореа): таксономия и распространение. — Казань: УНИПРЕСС ДАС, 2006. — 360 с.
2. Бурова Ю.А., Захаркина А.С., Королев Д.С. и др. Развитие фитопатогенных грибов при совместном культивировании с *Pseudomonas aureofaciens* 2006 / Проблемы лесной фитопатологии и микологии: междунар. конф., Ульяновск, 15 октября 2012 г. — Ульяновск: УЛГУ, 2012. — С. 120–124.
3. Быкова В.М. Сырьевые источники и способы получения хитина и хитозана / Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение. — М.: Наука. — 2002. — С. 7–23.
4. Власова Е.П. Салицилатгидроксилаза *Pseudomonas fluorescens* 142NF(рNF142): свойства и роль в гидроксировании феназинов: Дисс. на соиск. уч. степени канд. биол. наук: 03.01.06. — М., 2011. — 116 с.
5. ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести, введ. 1986.07.01. М.: Изд-во стандартов, 2004. — 62 с.
6. Логинов О.Н. Новые микробиологические препараты для сельского хозяйства и восстановления окружающей среды: Дисс. на соиск. уч. степ. д-ра биол. наук: 03.00.23. — Уфа, 2004. — 296 с.
7. Олюнина Л.Н., Шабеев В.П. Продуцирование индолил-3-уксусной кислоты ризосферными бактериями рода *Pseudomonas* в процессе роста // Микробиология. — 1996. — Т. 65. — № 5. — С. 813–817.
8. Позднякова Л.И. Методические рекомендации по выделению и изучению бактериальных ферментов пектолитического и протеолитического комплексов. — Саратов, 1981. — С. 3–11.
9. Саламатова Ю.А., Минаева О.М., Акимова Е.Е. Эффективности хранения ряда бактериальных препаратов в жидкой форме // Вестник Томского государственного университета. — 2010. — № 1(9). — С. 20–25.
10. Barea, J.M., Azcon R. and Azcon-Aguilar C. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality // Antonie Van Leeuwenhoek. — 2002. — Vol. 81. — P. 343–351.
11. Gordon S.A., Weber R.P. Colorimetric estimation of indolacetic acid // Plant Physiology. — 1951. — Vol. 26. — P. 192–195.
12. Haas D. and Defago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads // Nature Reviews Microbiology. — 2005. — Vol. 3 (4). — P. 307–319.
13. Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahafee W., Klopper J. Bacterial endophytes in agricultural crops // Can. J. Microbiol. — 1997. — Vol. 43. — P. 895–914.
14. Lugtenberg B., Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria // Annu. Rev. Microbiol. — 2009. — Vol. 63. — P. 541–556.
15. Pedraza R., Ramirez-Mata A, Xiqui M.L, Baca B. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria // FEMS Microbiol. Let. — 2004. — Vol. 233. — P. 15–21.
16. Ramamoorthy V., Raguchander T., Samiyappan R. Enhancing resistance of tomato and hotpepper to Pythium diseases by seed treatment with fluorescent pseudomonads // Euro. J. Plant Pathol. — 2002. — Vol. 108. — P. 429–441.
17. Suzukil S., Hel Y., Oyaizul H. Indole-3-acetic acid production in *Pseudomonas fluorescens* HP72 and its association with suppression of creeping bentgrass brown patch // Current Microbiol. — 2003. — Vol. 47. — N 2. — P.138–143.

STUDY OF CONTENT OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN THE CULTURE MEDIUM BACTERIUM PSEUDOMONAS AUREOFACIENS UNDER STORAGE

Ju.A. BUROVA, S.A. IBRAGIMOVA, V.V. REVIN

N.P. Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russia

The dynamics of changes in the content of indole-3-acetic acid, and a number of antibiotics phenazine (phenazine-1-carboxylic acid, 2-hydroxyphenazine-1-carboxylic acid, 2-hydroxyphenazine) in culture medium of bacterium *Pseudomonas aureofaciens* during storage was studied. Identified proteo-chitinolytic properties and the culture fluid.

Keywords: bacteria, *Pseudomonas aureofaciens*, culture medium, plant hormones, seeds, enzymes and antibiotics.

УДК 664.952

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК НА ОСНОВЕ ВЬЕТНАМСКОГО СЫРЬЯ В ПРОИЗВОДСТВЕ РЫБНЫХ КОЛБАС

ФАМ БИК ХА^{1*}, О.В. БРЕДИХИНА²

¹ ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет пищевых производств» Минобрнауки России,

² ФГУП «ВНИРО», Москва

Разработан состав рыбных колбас, в который входят фарш тилапии, мясо говядины, свиной шпиг, соевый белок и различные виды традиционных вкусоароматических добавок из Вьетнама, включая крахмал болотницы сладкой — для улучшения консистенции, лимонную траву — для свежего аромата, аурикулярию уховидную и момордику кохинхинскую — как функциональные пищевые компоненты.

Ключевые слова: рыбная колбаса, тилапия, *Auricularia auricula*, *Eleocharis dulcis*, лимонная трава, *Momordica cochinchinensis*, традиционные вкусоароматические добавки из Вьетнама.

В настоящее время наблюдается повышение спроса на готовые блюда, полуфабрикаты и фаршевую рыбную кулинарную продукцию. Одним из видов кулинарных изделий на основе рыбного сырья являются колбасы.

Для приготовления рыбных колбасных изделий предложено использовать новый вид сырья — пресноводную рыбу тилапия. Тилапия (*Tilapia*) — съедобная промысловая африканская рыба отряда окунеобразных массой 300–600 г и длиной до 40 см, которая водится в пресных и солоноватых водоемах. Тилапия — очень важный компонент в рационе африканцев в течение многих веков, а в последнее время ее специально разводят во многих странах Азии и Южной Америки, а также в США и Канаде, где она стала популярна.

Тилапия является одним из самых распространенных по потреблению видов рыб во всем мире, уступая по популярности лишь рыбам из семейства карповых. Специалисты одного из уэльских университетов открыли способ быстрого выращивания нильской тилапии, что, возможно, окажет значительное влияние на рыбное хозяйство Африки и Азии [1]. В 100 граммах тилапии содержатся: белки — 20 г, жиры

— 1,7 г, натрий — 52 мг, кальций — 10 мг, железо — 0,5 мг, фосфор — 170 мг и витамины.

На основании данных литературы предложено использование мяса тилапии в производстве рыбных колбас. Исходя из современных тенденций по разработке комбинированных рыбных фаршей на основе животного сырья, были проведены исследования по созданию рецептуры модельных образцов с заменой части рыбного сырья мясным (говядиной I сорта), с целью улучшения органолептических и структурно-механических показателей. В классических рецептурах рыбных фаршей в качестве стабилизирующих добавок, действие которых направлено на повышение вязкопластических свойств и влагоудерживающей способности фарша, в основном применялся картофельный крахмал. Однако в настоящей работе было предложено альтернативное сырье в качестве крахмала — болотница сладкая, которая широко применяется в пищевой промышленности Вьетнама и начинает появляться на российском рынке пищевых добавок.

Болотница сладкая (*Eleocharis dulcis*) имеет небольшие, округлой формы клубнелуковицы с хрустящей белой мякотью. Они являются популярным ингредиентом блюд китайской кухни. Во Вьетнаме их чаще всего едят в сыром виде, иногда подслащивают. Из болотницы получают крахмал, который используется для изготовления мучных и других видов изделий. Клубнелуковицы болотницы сладкой богаты углеводами (около 90% сухой массы), особенно крахмалом (около 60% сухой массы), а также служат хорошим источником клетчатки, рибофлавина, витамина B6, калия, меди и марганца. Растение может использоваться в лечебных целях. Крахмал болот-

© 2012 г. Фам Бик Ха, Бредихина О.В.

* Автор для переписки:

Фам Бик Ха

аспирант,

Московский государственный университет пищевых производств, Институт прикладной биотехнологии, кафедра «Технология мяса и мясных продуктов»

109316 Москва, ул. Талалихина, 33

Тел.: +7 (495) 677-03-16

E-mail: phamha2511@mail.ru

ницы сладкой обладает повышенной вязкостью, стабильностью, адгезией и водосвязывающей способностью [4].

Следовательно, в перспективе для рыбных колбас можно использовать мясо тилапии и крахмал болотницы сладкой.

В разработанный состав рыбных колбас входят фарш тилапии, свиной шпиг, мясо говядины, соевый белок и различные виды традиционных вкусоароматических добавок из Вьетнама. Кроме того, в состав включены: крахмал болотницы сладкой, лимонная трава для свежего аромата и аурикулярия уховидная (*Auricularia auricula-judae*) – грибы семейства Аурикуляриевых. В 100 г этого гриба содержатся: белки – 10,6 г, жиры – 0,2 г, целлюлоза – 7 г, кальций – 375 мг, железо – 185 мг, фосфор – 201 мг и витамины. Гриб ценится на Дальнем Востоке, особенно во вьетнамской кухне. Он употребляется для понижения холестерина в крови и лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Поэтому была рассмотрена возможность использования в рыбной колбасе аурикулярии уховидной как функционального пищевого компонента [3].

Использование момордики кохинхинской (*Momordica cochinchinensis*), или гака, – однолетнего травянистого вьющегося растения также позволяет обогатить продукцию функциональной добавкой. Плоды этого растения используются в традиционной медицине Вьетнама [2]. Гак растет во Вьетнаме, Китае, Индии, Тайланде, Лаосе, Камбодже, а также культивируется во Вьетнаме и других странах Юго-Восточной Азии. В Европе его содержат в ботанических садах и оранжереях. Гак не только широко применяется в медицине, но и в традиционной кухне Вьетнама в виде порошка, в состав которого входит: 23% ликопина; 3521 мг/кг бета-каротина; 61,9 мг/кг α -токоферола; 15% ненасыщенных жирных кислот ω -6 и 44% ω -9; 18% протеина. Использование порошка гака в производстве рыбных колбас не только способствует их обогащению полезными веществами, но и улучшает цвет и вкус продукции.

Сравнительная оценка органолептических показателей готовых рыбных колбас представлена в таблице 1.

По внешнему виду образцы с содержанием пищевых добавок превосходили образцы без добавок. Рыбная колбаса с содержанием добавок имела приятный аромат, нежный вкус, и сочность изделий была лучше, чем классическая.

По разработанным рецептурам (табл. 2) изготовлены рыбные колбасы с приятным вкусом, сбалансированные по аминокислотному составу, минеральным веществам и витаминам, обладающие функциональными

свойствами, способствующими восполнению дефицита эссенциальных веществ в организме человека.

Таблица 1

Органолептические показатели рыбных колбас

Продукция	Органолептические показатели рыбных колбас			
	внешний вид	консистенция	вкус	запах
Классическая рыбная колбаса	цвет серый, хорошо сохраняет форму	плотная	свойственный рыбе	свойственный рыбе
Рыбная колбаса с пищевыми добавками из Вьетнама	цвет красно-розовый, хорошо сохраняет форму	плотная, сочная	нежный вкус рыбы и специй	смешанный запах рыбы и лимон-грасса, имбиря

Таблица 2

Рецептура рыбных колбас из мяса тилапии

Сырье	Норма расхода, кг/100 кг сырья
Тилапия	60
Мясо говядины	15
Свиной шпиг	10
Порошок из момордики кохинхинской	4
Аурикулярия уховидная	4
Крахмал из болотницы сладкой	4
Белок соевый	3
Итого	100
Соль	1,7
Перец черный	0,2
Имбирь	0,3
Сахар	0,2
Лимонграсс	0,3

Таким образом, внедрение технологии рыбных колбас на основе мяса тилапии и пищевых добавок из вьетнамского сырья позволяет создать функциональные продукты с хорошими органолептическими показателями и оптимальной пищевой ценностью.

Литература

1. *Абрамова Л.С., Недосекова Т.М.* Перспективные технологии новых видов рыбной продукции // Рыбная промышленность. – 2004. – № 2. – С. 19–22.
2. Все о лекарственных растениях на ваших грядках / Под ред. Раделова С.Ю. – СПб: ООО «СЗКЭО», 2010. – 224 с. – С. 209.
3. *Двин Ф.* Грибы: Справочник. – М.: «Астрель», «АСТ», 2001. – 304 с. – С. 256.
4. *Porcher Michel H. et al.* 1995–2020, Sorting Eleocharis Names. Multilingual Multiscript Plant Name Database – A Work in Progress. Institute for Land & Food Resources. The University of Melbourne (2004).

THE USE OF FOOD ADDITIVES ON THE BASIS OF VIETNAMESE RAW MATERIALS IN THE PRODUCTION FISH SAUSAGES

HA BICH PHAM¹, O.V. BREDIHINA²

¹ *Moscow State University of Food Production*,
² *«VNIRO», Moscow*

The composition of fish sausages, which includes minced tilapia, beef, pork lard, soy protein and a variety of traditional flavors from Vietnam, including starch *Eleocharis dulcis* to improve consistency, lemon grass for fresh flavor, *Auricularia auricula* and *Momordica cochinchinensis* as functional food components.

Keywords: fish sausage, tilapia, *Auricularia auricula*, *Eleocharis dulcis*, lemon grass, *Momordica cochinchinensis*, traditional flavors from Vietnam.

КАК ИСКЛЮЧИТЬ ПОЯВЛЕНИЕ ЛОЖНО-ПОЗИТИВНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ?

А.В. ЧЕМЕРИС*, Э.Г. МАГДАНОВ, Р.Р. ГАРАФУТДИНОВ, В.А. ВАХИТОВ

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и генетики»
Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа*

В обзорной статье на большом материале обсуждаются причины ложно-положительных результатов при осуществлении ПЦР. Рассматриваются основные пути ДНК-контаминации и способы ее предотвращения и устранения.

Ключевые слова: ПЦР, ложно-положительная ПЦР, ампликон, пост-ПЦР стерилизация, пре-ПЦР стерилизация, контаминация, деконтаминация, загрязняющая ДНК, древняя ДНК, ДНКазы, УФ-свет, псорален, урацил-ДНК гликозилаза, ДНК-криминалистика.

Введение

ПЦР — высокочувствительная и при этом высокоспецифичная реакция. Однако для нее характерно получение в некоторых случаях как ложно-негативных, так и ложно-положительных результатов. И те, и другие представляют собой серьезную проблему, особенно при диагностических анализах. Ложно-положительная ПЦР может быть вызвана плохим подбором праймеров, которые, например, будут способны образовывать праймерные димеры, удлиняющиеся при действии ДНК-полимеразы. Также ложно-положительная ПЦР происходит из-за загрязнения исследуемых образцов нежелательной ДНК или аналогичными ампликонами из предыдущих реакций амплификации.

В настоящем исследовании нами проведен анализ работ методического плана, посвященных проблеме ложно-положительных результатов в ПЦР, вызванных присутствием посторонней ДНК, показывающий, что, начиная с 1988 г. по 2012 г., опубликовано более сотни статей, где рассматривались причины появления загрязняющей ДНК и способы недопущения этого. Практически сразу

после разработки варианта ПЦР с термостабильной ДНК-полимеразой стали выходить в свет многочисленные статьи, письма в редакции журналов, обзоры, в которых предлагались различные способы стерилизации ДНК и обсуждались вопросы специфичности и достоверности результатов ПЦР. Так, на период с 1990 по 1993 гг. приходится около половины всех методических работ по этому вопросу, причем в списке цитированной литературы к настоящей статье эта пропорция сохраняется, хотя приведены только наиболее значимые публикации, но большее внимание сознательно уделено работам последних лет. Исследователи, посчитав, что необходимые методы исключения ложно-положительных результатов в ПЦР уже предложены, с середины 1990-х гг. стали ими лишь пользоваться, не особо задумываясь о разработке новых подходов. Действительно, имеются довольно неплохие способы, позволяющие с той или иной степенью эффективности инактивировать загрязняющую ДНК, но это совсем не означает, что все вопросы ликвидации контаминации решены и ложно-положительных результатов можно не опасаться. Напротив, исходя из тенденций последних лет, свидетельствующих о все более массовом характере работ по изучению древней ДНК, увеличивающемся объеме криминалистических исследований, где количества анализируемого с помощью ПЦР материала, как правило, крайне малы, настоятельно требуется ужесточение контроля за наличием загрязняющей ДНК и разработка новых методов ее инактивации или, по крайней мере, совершенствование ныне применяемых. Аналогичная ситуация складывается для цифровой ПЦР, при которой ведется амплификация единичных копий, которыми никак не должны становиться молекулы посто-

© 2012 г. Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гаррафутдинов Р.Р., Вахитов В.А.

* **Автор для переписки:**

Чемерис Алексей Викторович

д.б.н., профессор,

зам. директора по науке Института биохимии и генетики

Уфимского научного центра РАН

450054 Уфа, просп. Октября, 71

Тел./факс: +7 (347) 235-60-88

E-mail: chemeris@anrb.ru

ронней ДНК, поскольку в случае присутствия таковых результаты экспериментов будут заметно искажены.

Все описанные ниже способы борьбы с загрязняющей ДНК относятся к методам проведения ПЦР по конечной точке, а также к цифровой ПЦР и к ПЦР в реальном времени, за исключением того, что проблема загрязнения лабораторного пространства наработанными ампликонами для последнего метода практически отсутствует.

Ложно-позитивная ПЦР-диагностика

Ложно-позитивные результаты при диагностике различных заболеваний, помимо того, что вызывают у пациентов отрицательные психологические эмоции, могут иметь и более серьезные последствия, вплоть до летальных исходов. Известен случай смерти молодой женщины, которой с помощью ПЦР ложно поставили диагноз боррелиоз — более известный в нашей стране как возвратный тиф, вызываемый переносимой иксодовыми клещами спирохетой *Borrelia burgdorferi*. В результате длительной неправильной антибиотикотерапии она умерла от оторвавшегося с конца катетера септического тромба, образованного размножившимися грибами рода *Candida* [42]. После появления цитируемой статьи в этот же журнал поступил отклик других авторов [38], которые сообщили, что в своей медицинской практике также столкнулись со случаем ложно-позитивной ПЦР-диагностики боррелиоза, но лечение не было начато.

К сожалению, подобные случаи не единичны, и в литературе сообщается о ложном диагностировании с помощью ПЦР различных заболеваний и, следовательно, проблема исключения ложно-позитивных результатов при проведении диагностической ПЦР стоит довольно остро. Так, в литературе имеется информация о высоком уровне недостоверных результатов при проведении ПЦР-диагностики, который, например, в 2004 г., по данным специальных исследований контроля качества, среди разных международных центров варьировал от 9 до 57% [5]. При этом считаем необходимым отметить, что не только ПЦР, но и другие методы детекции биополимеров дают ложно-позитивные результаты. И таких случаев (опубликованных) можно привести немало для любого метода, причем резонно предположить, что ситуаций с получением ложно-позитивных результатов возникает значительно больше, чем статей, написанных по их последствиям, поскольку часто это не тот материал, которым хочется со всеми поделиться.

Одной из первопричин ложно-позитивной ПЦР может служить плохой подбор праймеров, которые, например, могут образовывать праймерные димеры со способными к элонгации 3'-концами или к отжигу на иных местах генома(ов) и вести тем самым к наработке ложных продуктов. Подбор праймеров имеет важнейшее значение для проведения любой ПЦР, и этот вопрос выходит за рамки только ложно-позитивной ПЦР, в связи с чем в данном обзоре внимание ему уделено не будет. Можно лишь заметить, что в тех случаях, когда подобрать идеальную пару праймеров в силу особенностей анализируемых (искомых) последовательностей не удастся, прибегают к так называемому «горячему» или отложенному старту в ПЦР, заметно повышая специфичность отжига праймеров и соответственно всей реакции, что довольно подробно рассмотрено нами ранее [1].

Хотя для диагностики инфекционных и прочих заболеваний с помощью сертифицированных наборов, доступных из коммерческих источников, праймеры, как правило, подбираются с особой тщательностью и не должны образовывать ни димеров, ни отжигаться в случайных местах, тем не менее в литературе все же встречаются упоминания о неудачно подобранных праймерах, входящих в состав коммерческих наборов и приводящих к ложно-позитивным результатам [10, 20, 63]. Однако, если в реакционной смеси будет присутствовать загрязняющая ДНК, несущая амплифицируемый участок, то избежать ложно-позитивной ПЦР не удастся, причем с более качественно подобранными праймерами это произойдет даже быстрее.

Источники контаминации в ПЦР и простые способы их ликвидации

Ложно-позитивная ПЦР происходит, главным образом, ввиду изначального загрязнения реакционных смесей некоей ДНК (о происхождении которой речь будет идти ниже) ампликонами из предыдущих реакций с этими же или фланкирующими праймерами или перекрестной контаминацией образцов. Еще одним источником загрязнения могут служить рекомбинантные плазмиды, несущие фрагмент ДНК, часто используемый в качестве положительного контроля.

Однако прежде чем начать изложение всевозможных способов борьбы с загрязняющей ДНК, стоит, видимо, отметить, в каких ингредиентах ПЦР, а также где, включая разовую пластиковую посуду, лабораторную окружающую среду в виде рабочих поверхностей столов, различных приборов (автоматических пипеток, микро-

центрифуг, камер для гель-электрофореза, трансиллюминаторов и др.) и даже воздуха помещений с посторонней ДНК, с какой конкретно и в каких количествах можно в первую очередь столкнуться. Помимо загрязнения ампликонами из предыдущих реакций или рекомбинантными молекулами с клонированным фрагментом какого-либо гена, где ДНК представлена в чистом виде, готовом для амплификации, правильнее говорить о загрязнении ДНК-содержащим биологическим материалом в виде вирусных частиц, бактериальных клеток, слущивающихся чешуек кожи и пр.

Если ответить очень кратко на первые два вопроса «в каких?» и «где?», то ответ может быть очень простым — теоретически во всех и везде. Даже в чистой воде, которая хоть немного хранилась в накопительных емкостях, можно ожидать бактериальную ДНК. ДНК-полимераза практически никогда не бывает свободной от бактериальной ДНК (то же касается и других ферментов, задействованных в различных модификациях ПЦР, выделяемых из нативных микроорганизмов или из рекомбинантных штаммов). В бычьем сывороточном альбумине (БСА) присутствует животная ДНК (крупного рогатого скота). ДНТФ также часто загрязнены животной ДНК, поскольку их химический или ферментативный синтез осуществляется из нуклеотидмонофосфатов, которые производятся из ДНК, выделенной из биологического материала, что достается обычно после бойни. Кроме бактериальной и животной ДНК, человеческая ДНК может присутствовать повсеместно, ввиду того, что все, что делается для проведения ПЦР, включая ручное дозирование воды, рутинное взвешивание химических реактивов, их растворение, не происходит без участия человека и может быть загрязнено незаметно слущивающимися чешуйками кожи экспериментатора. При химическом синтезе олигонуклеотидов во время их последующей очистки происходит многократный контакт с готовящим их персоналом. ДНК-полимераза также выделяется и очищается, в том числе от бактериальной ДНК, людьми, которые привносят тем самым ДНК человеческую. И ДНТФ, и тот же БСА производятся с участием людей. Все оборудование для выделения, очистки нуклеиновых кислот, амплификации и детекции ее результатов теоретически, помимо человеческой, также может быть загрязнено как различной тотальной ДНК, так и ампликонами.

Что касается одноразовой посуды, то, как ни странно, она тоже часто бывает, помимо человеческой, загрязнена еще и прочей разной (в том числе бактериальной) ДНК. Интересное исследование провели немецкие

авторы [51], проанализировавшие источник загрязнения в своей лаборатории, приведший к ложно-положительной ПЦР. Ими было обнаружено, что пластиковые пробирки производства разных фирм, только что взятые из заводской картонной упаковки, оказывались загрязненными человеческой ДНК (в качестве мишени для амплификации они использовали фрагмент митохондриальной ДНК человека), причем количество загрязненных пробирок от разных производителей в их опытах варьировало от 20 до 80%. При этом они показали, что пробирки, простерилизованные разными способами ими самими и содержащие реакционную смесь без ДНК, выдерживаемые продолжительное время в открытом виде в обычном лабораторном помещении, не давали ложно-положительных результатов, что свидетельствовало о незагрязненном воздухе их лаборатории и о реальном загрязнении используемой лабораторной посуды однократного применения.

Тщательное исследование воздуха помещений на наличие загрязняющей ДНК выполнила международная группа авторов из Великобритании и Германии [62]. Они экспонировали открытые пробирки в течение длительного времени (до 24 часов) в УФ-боксе для ПЦР, в лабораторном помещении и на столе при входе в большую офисную комнату, где работало 14 человек, и затем оценивали загрязнение чужеродной ДНК с помощью ПЦР в реальном времени с праймерами, специфичными к высококопийным *Alu*-повторам человека, к повторяющейся мышшиной ДНК, к межгенному спейсеру ITS2 рДНК грибов и к бактериальной 16S рДНК. При этом было зафиксировано два случая присутствия загрязняющей человеческой ДНК в довольно больших количествах (в виде 194 и 585 изначальных копий), принадлежащей, скорее всего, оператору, внесшему ее в реакционную смесь во время обращения с пробирками. Во всех остальных образцах также было зафиксировано появление человеческой ДНК, ДНК грызунов; в меньшей степени проявилось бактериальное загрязнение и еще более редким событием было обнаружение грибной ДНК.

Для оценки чистоты рабочих помещений была проделана работа, в ходе которой другими авторами было взято 70 мазков из разных мест лаборатории и затем в них обнаружено присутствие ампликонов, представляющих собой фрагмент вируса герпеса человека, с которым они как раз работали [12]. Очистка лабораторных поверхностей 1М HCl позволила им удалить все загрязнения. Для стерилизации ампликонов также были применены 2М HCl и хлорокс (10% гипохлорит натрия), причем оказалось, что последний реагент действовал даже более

эффективно [44]. Ампликоны из дальнейшей амплификации исключал и гидрохлорид гидроксилamina в концентрации 250 мМ, с высокой эффективностью модифицируя цитозинозные остатки и предотвращая их спаривание с гуанинами [3]. Однако все эти химикаты довольно агрессивны, и не все поверхности и тем более приборы и оборудование ими можно обрабатывать. В настоящее время американской фирмой Molecular BioProducts, Inc. производится готовая к употреблению неагрессивная жидкость под торговой маркой DNA AWAY, пригодная для инактивации молекул ДНК. Недавно японскими авторами предложен новый способ очистки лабораторных помещений от загрязняющей ДНК [39]. Его особенностью является то, что обработка как поверхностей, так и воздуха лаборатории ведется газообразным составом на основе метанола, содержащим несообщаемые в работе компоненты, образующие радикалы, которые вызывают разрывы цепей ДНК.

К ложно-положительной ПЦР может приводить и перекрестное загрязнение образцов. Примером такого загрязнения служит ситуация, когда в модельном эксперименте для выделения ДНК специальной вырубкой из фильтровальной бумаги, на которой хранились образцы высушенной крови, готовились высечки одинакового размера [4]. Оказалось, что если никак не обрабатывать эту вырубку между высечками, то после выделения ДНК из этих дисков и проведения ПЦР ложно-положительные результаты прослеживаются за истинно-положительным в 13 последующих пустых образцах. Эти авторы апробировали разные способы стерилизации инструмента, включая открытое пламя бунзеновской горелки, и пришли к выводу, что наиболее эффективной для удаления загрязняющей ДНК является обработка коммерческим отбеливателем с последующей промывкой водой и этанолом. Здесь можно заметить, что для каких-либо других анализов, менее чувствительных, чем ПЦР, возможно, и не требовалось бы как-то дополнительно обрабатывать вырубку после каждого акта вырезания, но в случае ПЦР попадающего в следующей образец количества крови, остающейся на вырубке, вполне хватало для выделения из нее достаточного для детекции числа молекул ДНК. В чем-то сходные результаты были приведены в другой работе, где авторы обследовали разные части нескольких микротомов, используемых для приготовления парафиновых срезов, и нашли контаминацию загрязняющей ДНК, которая при попытке обнаружения микроорганизма *Bartonella spp.* приводила к ложно-положительной ПЦР [58]. В литературе имеются сведения о наличии остаточного загрязнения гастроскопов бактерией

Helicobacter pylori, выявляемой с помощью ПЦР [46], а также прочих медицинских инструментов другими микроорганизмами.

Конечно, все эти загрязняющие молекулы ДНК могут присутствовать в ингредиентах для ПЦР, включая одноразовую посуду, инструменты и т.д., как правило, в малом числе копий, и поэтому при проведении большинства обычных диагностических анализов или большинства научно-исследовательских экспериментов, где стартовые количества целевой ДНК измеряются сотнями и тысячами копий, загрязняющей ДНК можно просто пренебречь и не опасаться ложно-положительных результатов из-за относительно небольшого числа устанавливаемых программируемых циклов ПЦР (обычно 25–30), поскольку, если искомая мишень действительно присутствует, то ее удастся за это время детектировать. Если нет — значит ее нет. Однако при работе с древней ДНК или ДНК, выделенной из подчас крохотных следов, обнаруженных на месте преступления, или в некоторых иных случаях, когда исходное число искомым копий крайне ограничено и число циклов должно быть увеличено, важность исключения загрязняющей ДНК становится очевидной, и надо обязательно предпринимать необходимые меры по ее удалению. Бурно развивающаяся в последние годы цифровая ПЦР, рассчитанная на детекцию единичных копий мишеней, для исключения неточного результата должна быть свободной от загрязняющей ДНК, имеющей места отжига для используемых праймеров, и этому вопросу должно уделяться повышенное внимание.

Необходимо различать эксперименты, в которых присутствие даже малого количества загрязняющей ДНК очень опасно, от остальных, в которых загрязняющая ДНК (даже способная служить матрицей для конкретной пары праймеров) может присутствовать в реакционной смеси (и даже не в единичных копиях), но при этом она в целом не в состоянии исказить результаты ПЦР, поскольку стартовое число копий во вносимой анализируемой ДНК много больше. Так, австрийские авторы [57], например, установили для себя допустимый уровень присутствия в лаборатории загрязняющей ДНК, который они оценили в 17,4 пг/мл реакционной смеси, что соответствует приблизительно 3 копиям диплоидного генома человека, которым, по их мнению, можно пренебрегать. Основываясь на этом допустимом уровне загрязнения, ими было подсчитано, что при детекции фрагментов митохондриального генома, характеризующегося высокой копийностью в клетке и способного достигнуть загрязняющего количества в виде 300 копий на образец, следует брать для анализа количество ДНК

человека, составляющее не менее 500–1000 копий в пересчете на митохондриальный геном. При этом в цитируемой статье отмечается, что загрязняющая человеческая ДНК присутствует в реагентах, а другим источником служит сам оператор. Использование праймеров, специфичных к геномам курицы и китайского хомяка, не привело в их экспериментах к амплификации искомым последовательностей ввиду отсутствия таковых в качестве загрязнителей.

Таким образом, важным представляется еще и то, несет ли загрязняющая ДНК участки для отжига праймеров. Экспериментатору можно несильно опасаться посторонней ДНК (при этом здесь не имеются в виду ампликоны со сходной последовательностью нуклеотидов из предыдущих реакций, а подразумевается обычная ДНК, которая бывает в этих случаях все же преимущественно человеческой или бактериальной), если мишенью для амплификации служат, например, гены каких-либо растений, и специфичность ПЦР в этом случае в первую очередь будет обеспечиваться уже качеством подбора праймеров. Однако, если в той же лаборатории ведется работа по молекулярному клонированию и имеются рекомбинантные клоны (плазмиды, фагмиды, фаги и др.), содержащие анализируемый ген, участки ДНК которого служат мишенью для амплификации, то тогда рабочие поверхности, воздушное пространство теоретически могут нести довольно значительное число копий загрязняющей клонированной ДНК, которое уже будет представлять угрозу достоверности результатов при проведении ПЦР даже с применением большого стартового количества анализируемого материала. В этом случае надо предпринимать определенные усилия, чтобы исключить попадание рекомбинантных молекул в реакционную смесь для ПЦР при ее составлении, в том числе в исходные ингредиенты (буферы, ферменты, прочие реагенты) при их приготовлении и работе с ними.

Не меньшее, если не большее число копий загрязняющей ДНК, чем при молекулярном клонировании, может подняться в воздух при открытии реакционных пробирок по завершении ПЦР. Так, в результате стандартной ПЦР обычно в 10–100 мкл оказывается около 10^{11} – 10^{13} ампликонов. После проведения ПЦР в ДНК-термоциклере с «горячей крышкой» (не требующего слоя вазелинового масла) при открытии пробирки из-за возникающего разрежения создается движение воздуха, поднимающее мельчайшую воздушно-капельную смесь, каждый пиколитр которой может содержать около 10^4 – 10^5 наработанных ампликонов, готовых стать матрицами для новой ПЦР. Учитывая высокую чувствитель-

ность данной реакции, необходимо как-то не дать этим ампликонам вовлечься в новую амплификацию. Самым простым и несложным способом уменьшить образование брызг и аэрозолей при открытии пробирок является предложенная очень давно предварительная заморозка реакционной смеси по окончании ПЦР [23].

Первой работой, где было обращено внимание научного сообщества на возможность получения при проведении ПЦР ложно-положительных результатов, возникающих из-за загрязнения нежелательной ДНК, стала статья английских авторов [35], в которой рекомендовалось работать аккуратно и в обязательном порядке использовать при постановке реакции негативные контроли с водой вместо анализируемой ДНК. Следом за ней появилась статья с более конкретными рекомендациями по недопущению загрязнения готовящейся смеси ПЦР ампликонами из предыдущих реакций [34]. Так, в качестве одного из относительно простых решений исключения попадания ампликонов в новую реакционную смесь в цитируемой статье было рекомендовано физическое разделение специальных зон выделения ДНК и формирования реакционной смеси, непосредственно термоциклирования, открытия пробирок и анализа продуктов с помощью гель-электрофореза или другого подходящего метода путем размещения их (зон) в отдельных помещениях. В качестве некоторых других предостережений, упомянутых в той работе, можно отметить рекомендации по предварительному разделению реагентов на аликвоты; по использованию одноразовых перчаток, которые желательно менять почаще или, по крайней мере, входя в зону выделения ДНК; по применению пробирок с нетугими крышками, не требующих больших усилий для открытия, которые могли бы привести к большему разбрызгиванию микрокапель. Также содержался совет в качестве положительного контроля не использовать высококонцентрированные растворы рекомбинантных плазмид, а ограничиваться приблизительно 100 копиями искомой мишени, и при составлении смеси ПЦР негативный контроль формировать в конце, а исследуемую ДНК в соответствующие пробирки добавлять в самую последнюю очередь. С учетом всех этих рекомендаций другая исследовательская группа наблюдала различия в результатах независимого проведения ПЦР тремя экспериментаторами, пользовавшимися одними и теми же материалами и оборудованием [33]. При этом оказалось, что у одного из них ложно-положительных результатов не наблюдалось вовсе, тогда как у двух других они возникали попеременно, в том числе удалось установить, что у одного происходило загрязнение реакционной смеси

его мертвыми эпидермальными клетками, что лишней раз свидетельствует о необходимости очень тщательно соблюдать чистоту экспериментов. К числу первых работ, указавших на источники контаминации при проведении ПЦР, следует отнести также исследование Porter-Jordan K., Garret C.T. (1990) [43].

Условно физическим способом недопущения загрязнения рабочих помещений ампликонами можно считать пространственную разобщенность разных зон, о чем упоминалось выше, а также правильно организованное в них однонаправленное перемещение образцов. При этом желательным является создание в помещении, где проводятся работы по выделению ДНК и формированию реакционных смесей, несколько повышенного давления воздуха и, наоборот, легкого разрежения в помещении, где проводится сама ПЦР и ведется анализ результатов реакции.

Однако все эти простые способы исключения появления ложно-положительной ПЦР сами по себе недостаточны, и требуются дальнейшие усилия по устранению загрязняющей ДНК.

Основные способы деконтаминации при ПЦР

Прежде чем перейти к изложению более сложных способов исключения/стерилизации загрязняющей ДНК, необходимо заметить, что такие процессы деконтаминации еще делят на пре-ПЦР-стерилизацию, в которой удаляют загрязняющую ДНК на стадии формирования реакционной смеси, и пост-ПЦР-стерилизацию, когда реакционная смесь готовится изначально такой, что по завершении ПЦР до открытия пробирок наработанные ампликоны можно превратить в непригодные для дальнейшей репликации. Некоторые подходы для ликвидации загрязняющей ДНК в различных модификациях используются в обоих вариантах стерилизации.

УФ-облучение. Относительно просто и в целом довольно эффективно сделать ДНК непригодной к ампликации в ПЦР можно с помощью УФ-света [49]. Повреждающее действие ультрафиолетового облучения на ДНК проявляется в виде образования циклобутановых димеров пиримидинов, главным образом, тимин-тиминовых димеров, формирования пиримидин-пиримидиновых фотоаддуктов, окисления азотистых оснований, внесения одно- и двухцепочечных разрывов. Причем, всем этим повреждениям в гораздо большей степени подвержена двухцепочечная ДНК, несущая в своей последовательности соседние нуклеотиды ТТ, СТ, ТС или СС, нежели аналогичная одноцепочечная. Во мно-

гих работах отмечается, что метод ДНК-стерилизации УФ-облучением весьма сильно зависит от длины волны ультрафиолетового света, мощности лампы, расстояния обработки, ее длительности, а также от размера амплифицируемого целевого участка ДНК и последовательности нуклеотидов в нем [11, 41, 50].

Ультрафиолетовому облучению подвергают как уже готовую смесь для проведения ПЦР (без добавления анализируемой ДНК, разумеется), так и заранее готовые отдельные ингредиенты. При этом необходимо отметить, что Taq полимеразы после 20-минутного облучения теряет свою активность, что заставляет думать об иных способах стерилизации этого компонента ПЦР. В литературе имеются предложения по обработке УФ-светом коммерческих препаратов праймеров для исключения загрязняющей их ДНК [26]. При этом, видимо, желательно, чтобы праймеры в своей последовательности не содержали соседних пиримидиновых азотистых оснований. В некоторых статьях указывается на то, что присутствие в готовой реакционной смеси большого количества дНТФ, сильно поглощающих в ультрафиолетовой области, заметно снижает эффективность удаления загрязняющей ДНК при обработке готовой смеси УФ-светом [21, 41]. Сами дНТФ оказались устойчивы к ультрафиолетовому облучению [40].

Некоторыми авторами отмечается, что длительная обработка вазелинового масла (как одного из составляющих ПЦР смеси) ультрафиолетом с длиной волны 254 нм приводит к ингибированию амплификации, видимо, ввиду окисления образующимся озоном компонентов масла, причем степень торможения была прямо пропорциональна длительности облучения [15]. В другой работе было показано, что УФ-обработка вазелинового масла при условии добавления в него в качестве антиоксиданта оксихинолина не приводила к эффекту ингибирования ПЦР [24]. Также об ингибировании ПЦР в полипропиленовых пробирках, подвергнутых воздействию УФ-света, говорится в другой статье, причем добавление водного раствора, содержащего в качестве антиоксидантов или тот же оксихинолин вместе с аскорбиновой кислотой и пропилгаллатом, или α -токоферол, с последующей аспирацией растворов, не снижало уровня ингибирования [7].

Однако есть и сообщения о том, что не удастся элиминировать контаминацию ПЦР смеси с помощью ультрафиолетового облучения [16]. Другими авторами было подсчитано, что 45-минутная обработка ультрафиолетом специально загрязненных 500 (пятистами) пг ДНК пластиковой посуды (пробирок, наконечников, планшетов) и воды оставила из этого количества нетро-

нутыми 6 пг, которые и послужили матрицами для последующей ПЦР [55]. Обнаружено, что УФ-облучение сухой ДНК, находящейся на рабочих поверхностях в лабораторных помещениях, оказывает на нее не столь заметное повреждающее действие, как на ДНК, находящуюся в растворенном состоянии [19]. При этом еще крайне желательно, чтобы УФ-свет падал перпендикулярно на обрабатываемую поверхность, а трехмерные объекты (автоматические пипетки, например) вообще не могут быть эффективно обеззаражены.

Подводя некоторый итог имеющимся сведениям об успешности обработки реагентов для ПЦР одним ультрафиолетовым светом, можно заключить, что хотя данный подход и довольно широко используется из-за своей простоты и доступности, его эффективность все же недостаточна, и в особо важных случаях требуется применение других методов стерилизации ДНК, в том числе с помощью УФ-света вместе с некоторыми веществами, становящимися реакционноспособными под его воздействием.

Обработка ДНКазми. Один из самых загрязненных нежелательной ДНК ингредиентов ПЦР — это ДНК-полимераза, что отмечается во многих статьях [6, 30, 52]. Специально производимая американской фирмой Applied Biosystems Taq полимераза, имеющая маркировку LD (Low DNA) гарантированно содержит не более 10 копий бактериального гена 16S рРНК (и соответствующего количества остальной геномной ДНК) на 5 единиц активности фермента. Действительно, загрязняющая термостабильную ДНК-полимеразу ДНК, как правило, имеет бактериальное происхождение, и принадлежит или нативному микроорганизму, или рекомбинантному штамму *E. coli* в случае продуцирования фермента с клонированного гена. Наиболее простым способом уменьшить количество загрязняющей ДНК в реакционной смеси и повысить соотношение «сигнал/шум» при амплификации фрагментов ДНК, выделенных из малочисленных бактерий, является уменьшение количества используемого фермента в реакции. Так, в одной работе было достигнуто 10-кратное уменьшение содержания загрязняющей ДНК путем соответствующего разбавления Taq полимеразы при сохранении успешного протекания ПЦР [54].

Как уже отмечалось выше, ДНК-полимеразу не рекомендуется подвергать ультрафиолетовой обработке по причине довольно быстрой инактивации в этих условиях ферментативной активности. Поэтому были предложены другие способы очистки данного фермента от ДНК. Наиболее распространенным способом стала

ДНКазная обработка ферментного препарата [17, 22]. Помимо самой ДНК-полимеразы, во многих работах предлагается обрабатывать ДНКазой и другие компоненты ПЦРной смеси по отдельности или целиком до внесения анализируемой ДНК [28]. Так, например, после ДНКазной обработки составленной реакционной смеси была проведена успешная амплификация древней ДНК [17].

Недостатком этого метода является то, что ДНКазы способна сохранять свою активность после температурной денатурации и, следовательно, разрушать добавленную исследуемую ДНК и нарабатываемые ампликоны. Полностью инактивировать ДНКазную активность в одной работе удалось лишь с помощью 30-минутной обработки при 80 °С в присутствии дитиотрейтола [53]. Имеются также данные о том, что инактивация ДНКазы происходит за 10 мин. при 95 °С в буфере, рН которого должен быть или ниже 7, или выше 9 [27]. Ранее сообщалось, что для инактивации ДНКазы до внесения анализируемого образца потребовался 50-минутный прогрев при 94 °С готовой смеси для проведения ПЦР [29].

Удаление нежелательной ДНК возможно также с помощью различных частотцепающих рестрикционных эндонуклеаз, которыми обрабатывали или только фермент Taq полимераза, или все компоненты реакции [2, 8, 22]. При этом, однако, сами рестриктазы, будучи бактериальными ферментами, могут нести остаточные фрагменты геномной ДНК и тем самым вносить их в реакционную смесь. Другим серьезным недостатком этого подхода служит то, что рестрикционные эндонуклеазы могут и не разрушить постороннюю ДНК в нужных местах из-за отсутствия там сайтов узнавания этих ферментов.

Для пре-ПЦР-стерилизации также предложено использовать экзонуклеазу III, которая отщепляет мононуклеотиды с 3'-конца двухцепочной ДНК в направлении 3'→5' [64]. Было разработано два отличающихся протокола, при этом авторы в качестве дополнительного важного момента улучшения результатов ПЦР указали на способность данного фермента ликвидировать праймерные димеры в случае их образования. Тем не менее использование экзонуклеазы III для исключения ложноположительной ПЦР не нашло широкого применения.

Применение фотосенсибилизаторов. Известно, что псоралены, представляющие собой фурукумарины и встречающиеся в некоторых растениях, образуют под действием ультрафиолета с ДНК разнообразные фотоаддукты. Основываясь на этом их свойстве, японскими авторами был предложен еще один подход к пре-ПЦР-

стерилизации [32]. Так, в модельном эксперименте они продемонстрировали, что предынкубация ДНК с псораленом (был взят 8-метоксипсорален), сопровождаемая последующей обработкой УФ-светом, приводит к необратимой модификации ДНК, исключая ее из дальнейшего процесса амплификации. Затем группой американских авторов было показано, что псорален (было использовано другое его производное — 5-метилизопсорален) можно использовать в качестве пост-ПЦР-стерилизующего агента [11, 31]. Поскольку сам по себе псорален не ингибирует работу Таq полимеразы, то его добавляли в реакционную смесь и вели амплификацию, по завершении которой пробирки были облучены УФ-светом, приведшим к образованию фотоаддуктов псоралена с ампликонами, превратив их в безопасные для дальнейшей ПЦР. Целый ряд статей был посвящен процессам оптимизации использования производных псоралена для исключения ложно-положительных ПЦР. Так, было обнаружено, что изопсорален в довольно низких концентрациях эффективно стерилизовал 10^{11} ампликонов, но при этом имело место заметное ингибирование самой ПЦР [13].

В одной из статей предлагалось использовать 8-метоксипсорален для очистки Таq полимеразы от загрязняющей ДНК за счет образования фотоаддуктов, причем благодаря относительно короткой экспозиции ингибирования работы самого фермента не происходило [30]. Аналогичное «выключение» из процесса репликации/амплификации двухцепочечных молекул ДНК, содержащихся в препарате Таq полимеразы, было достигнуто с помощью аналога бромида этидия — моноазида этидия, который также интеркалирует в ДНК и под действием УФ-света ковалентно связывается с ней, лишая ее способности служить матрицей для ДНК-полимеразы [47].

Инактивация урацилсодержащих ампликонов. Урацил-ДНК-гликозилаза (УДГ) в системе *in vitro* способна элиминировать в двухцепочечной ДНК остаток урацила путем расщепления N-гликозидной связи между данным азотистым основанием и сахарофосфатным скелетом, приводя к образованию цепи ДНК с апириимидиновым местом, который при репликации не может быть пройден ДНК-полимеразой, останавливая тем самым дальнейший синтез цепи ДНК. Данное свойство этого фермента было успешно применено для предотвращения возникновения ложно-положительной ПЦР [36]. В цитируемой работе с использованием УДГ было разработано два варианта ПЦР, один из которых был рассчитан на множественное включение в ампликоны дУМФ, а в другом

применялись олигонуклеотидные праймеры, в которых во время химического синтеза Т был заменен на dU. Таким образом, при формировании новой реакционной смеси с дУТФ вместо ТТФ в нее также добавляется УДГ, которая случайно попавшие туда ампликоны из предыдущих реакций, содержащие во всей своей последовательности или только в праймерных участках урацилы, их разрушит, не позволив ДНК-полимеразе осуществлять полноценное копирование матриц. После температурной денатурации УДГ в основном теряет свою активность и вновь нарабатываемые ампликоны уже не подвергаются разрушению. На самом деле урацил-ДНК-гликозилаза, выделенная из бактерии *E. coli*, все же не только после первого этапа денатурации, но и после завершения всей ПЦР частично сохраняет (точнее восстанавливает) свою активность, и, как было показано, длительное хранение dU-ампликонов при 4 или 25 °C приводит к их заметному разрушению [56]. Более предпочтительным выглядит использование термолабильного варианта данного фермента. Подобные урацил-ДНК-гликозилазы в настоящее время производятся несколькими фирмами. Так, УДГ из морской бактерии под торговой маркой AmpErase[®], полностью теряющую свою активность при 95 °C, поставляет фирма Roche. 10 мин. при 65 °C достаточно для инактивации фермента НК-UNG, производимого фирмой Epicentre Technologies. Еще менее стойкую урацил-ДНК-гликозилазу, выделенную из арктической трески и необратимо теряющую свою активность уже при 50 °C, поставляет норвежская фирма ArcticZymes AS.

Успешная деконтаминация содержащих урацил ампликонов из предыдущих амплификаций с помощью урацил-ДНК-гликозилазы была продемонстрирована при работе с древней ДНК, причем, используя специальный штамм *E. coli*, не способный выщеплять остатки урацилов в ДНК, авторы смогли клонировать полученные ПЦР-продукты с урацилами в их составе [45].

Обработка РНКазами. Включение в праймер(ы) нетипичных оснований, например, в виде расположения на 3'-конце рибозного остатка, позволяет, по мнению авторов метода, вести пре-ПЦР-стерилизацию с помощью РНКазы А или пост-ПЦР-стерилизацию путем обработки NaOH, которую потом необходимо нейтрализовать посредством HCl [61]. Причем, в модельных экспериментах после добавления в реакционную смесь 10^8 ампликонов после проведения их стерилизации в режиме пре-ПЦР и пост-ПЦР происходило разрушение 10^4 и 10^6 матриц, соответственно. Некоторым недостатком метода является устойчивость РНКазы А к высокой температуре, и, чтобы вызвать ее температур-

ную денатурацию, в реакционную смесь надо добавлять меркаптоэтанол или другой агент, разрывающий сульфгидрильные связи.

Сравнение способов деконтаминации. Ряд статей посвящен сравнению методов стерилизации загрязняющей ДНК [18, 48, 59]. Так, в одной из работ [48] были апробированы методы пост-ПЦР-стерилизации с помощью изопсоралена и щелочного гидролиза ампликонов, наработанных с помощью 3'-рибопраймеров, а также пре-ПЦР-стерилизация обработкой dU содержащих ампликонов урацил-ДНК-гликозилазой; причем авторы делают вывод, что все способы показали хорошие результаты в виде инактивации до 10^9 копий ампликонов и исключения тем самым ложно-положительных результатов. Другие авторы испытали эффективность стерилизации с помощью изопсоралена и УДГ и обнаружили, что оба метода эффективно инактивируют ампликоны независимо от их GC-состава в том случае, когда размер последних превышает 100 пн [18].

Прочие способы деконтаминации и их сочетания. Отечественными авторами предложено очищать реагенты для ПЦР, включая Taq полимеразу в комплексе с антителами, от загрязняющей ДНК с помощью сорбции последней на DEAE-целлюлозе, сопровождаемой центрифугированием для сбора очищенного раствора [25]. Ранее для удаления загрязняющей ДНК из реагентов для ПЦР было рекомендовано использовать ультрафильтрацию [37, 60].

Довольно эффективным методом пре-ПЦР-стерилизации мог бы быть способ разрушения загрязняющей ДНК с помощью γ -излучения. Уже достаточно давно было показано, что облучение дозой в 150 кРад исключает ДНК из амплификации без заметного воздействия на остальные компоненты ПЦР [14], однако доступность подобных гамма-установок весьма ограничена.

Относительно недавно французские авторы провели детальное исследование существующих методов исключения ложно-положительных результатов в ПЦР и пришли к выводу, что ни один из ранее предложенных способов деконтаминации не в состоянии обеспечить должную степень чистоты, и только комплексный подход может привести к исключению ложно-положительной ПЦР [9]. Так, для стерилизации воды они использовали γ -радиацию, для удаления загрязняющей ДНК из растворов праймеров, ДНК-полимеразы и дНТФ применили ферментативное расщепление с помощью специфичной к двухцепочечной ДНК термостабильной ДНКазы, а прочие ингредиенты обрабатывали ультрафиолетовым светом.

Заключение

Практически все, с чем сталкивается экспериментатор при постановке ПЦР, в той или иной степени может быть загрязнено различной ДНК и главным образом — человеческой. Безусловно, если предпринимать определенные предосторожности в виде использования специальной одежды, работы в ламинарном или в ПЦР-боксе, применения автоматических пипеток с противозагрязняющими фильтрами-барьерами в наконечниках, обработки воздуха и рабочих поверхностей ультрафиолетовым светом, предварительного дозирования всех реагентов на небольшие аликвоты и т.д., то загрязнение человеческой ДНК, ампликонами, рекомбинантными плазмидами или перекрестное загрязнение образцов можно свести к минимуму, что однако не всегда достаточно, поскольку в некоторых случаях требуется абсолютное отсутствие посторонней ДНК.

Так, при работе с очень малым стартовым числом копий исследуемой ДНК наиболее оптимальным подходом для проведения высокоспецифичной и достоверной ПЦР будет, по-видимому, следующий. Помимо неукоснительного выполнения всех вышеупомянутых основных требований, главная забота должна проявляться о составлении реакционной смеси. Чтобы исключить возможное или, точнее, почти неизбежное попадание человеческой ДНК в готовящуюся реакционную смесь (ввиду ее практически обязательного присутствия в различных ингредиентах для проведения ПЦР), наиболее надежным способом является разрушение случайным образом попавшей туда ДНК с помощью термостабильной ДНКазы, выделенной из арктической креветки и специфично разрушающей только двухцепочечную ДНК (что позволит включать в реакционную смесь также требующие очистки от следов загрязняющей ДНК олигонуклеотидные праймеры). Генно-инженерная версия этого фермента, производимая норвежской фирмой ArcticZymes AS, инактивируется всего за 1 минуту уже при 55 °С, исключая тем самым свое влияние на амплифицируемую ДНК, ведущую происхождение от как раз представляющей интерес для экспериментатора и добавляемой уже после обработки ДНКазой и следующим за ней высокотемпературным прогревом анализируемой ДНК. Весьма важным моментом для исключения контаминации исследуемых образцов ДНК загрязняющей ДНК при безусловном соблюдении всех необходимых условий служит проведение предварительной инкубации составленной реакционной смеси в течение 4–5 пре-ПЦР-циклов для того, чтобы загрязняющая ДНК,

находящаяся в слущенных чешуйках кожи или в других биологических следах, сохраняющих свою целостность и фактическую недоступность находящейся «внутри» ДНК для действия ДНКазы, «вышла» в раствор и подверглась ферментативному разрушению. Одной из ошибок многих экспериментаторов является именно обработка ДНКазой реакционной смеси без предварительной имитации ПЦР, в результате чего загрязняющая ДНК, находящаяся внутри неких (разнообразных) биологических тканей, клеток на этой стадии сохраняется, а потом при термическом циклировании при проведении ПЦР такие биологические структуры частично разрушаются, ДНК из них выходит в раствор и после очередного этапа денатурации становится матрицей для отжига праймеров, успешно конкурируя с исследуемой ДНК и приводя к неадекватным результатам.

Завершая на этом данную статью, по-видимому, стоит еще раз заметить, что в настоящее время для проведения ПЦР должны быть конкретизированы условия исключения ложно-положительных результатов для разных вариантов этой реакции, принимая во внимание их предназначение и прочие особенности.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (Государственный контракт № 16.518.11.7047, Соглашение № 8046).

Литература

1. Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Машков О.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис А.В. ПЦР с отложенным (горячим или задержанным) стартом // Биомика. — 2011. — Т. 2. — С. 1–8.
2. Ashkenas J., Dennis J.W., Ho C.Y. Simple enzymatic means to neutralize DNA contamination in nucleic acid amplification // *Biotechniques*. — 2005. — Vol. 39. — P. 69–73.
3. Aslanzadeh J. Application of hydroxylamine hydrochloride for post-PCR sterilization // *Mol. Cell. Probes*. — 1993. — Vol. 7. — P. 145–150.
4. Bonne N., Clark P., Shearer P., Raidal S. Elimination of false-positive polymerase chain reaction results resulting from hole punch carryover contamination // *J. Vet. Diagn. Invest.* — 2008. — Vol. 20. — P. 60–63.
5. Borst A., Box A.T.A., Fluit A.C. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestion for a prevent and destroy strategy // *Eur J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* — 2004. — Vol. 23. — P. 289–299.
6. Boettger E.C. Frequent contamination of Taq polymerase with DNA // *Clin. Chem.* — 1990. — Vol. 36. — P. 1258–1259.
7. Burgess L.C., Hall J.O. UV light irradiation of plastic reaction tubes inhibits PCR // *Biotechniques*. — 1999. — Vol. 27. — P. 252–256.
8. Carroll N.M., Adamson P., Okhravi N. Elimination of bacterial DNA from Taq DNA polymerases by restriction endonuclease digestion // *J. Clin. Microbiol.* — 1999. — Vol. 37. — P. 3402–3404.
9. Champlot S., Berthelot C., Pruvost M., Bennett E.A., Grange T., Geigl E.-M. An efficient multistrategy DNA decontamination procedure of PCR reagents for hypersensitive PCR applications // *PLoS ONE*. — 2010. — Vol. 5. e13042.
10. Choi J.H., Velayati A., Stubblefield B.K., Orr-Urtreger A., Gan-Or Z., Tayebi N., Sidransky E. False-positive results using a Gaucher diagnostic kit-RecTL and N370S // *Mol. Genet. Metab.* — 2010. — Vol. 100. — P. 100–102.
11. Cimino G.D., Metchette K.C., Tessman J.W., Hearst J.E., Isaacs S.T. Post-PCR sterilization: a method to control carryover contamination for the polymerase chain reaction // *Nucl. Acids Res.* — 1991. — Vol. 19. — P. 99–107.
12. Cone R.W., Hobson A.C., Huang M.L., Fairfax M.R. Polymerase chain reaction decontamination: the wipe test // *Lancet*. — 1990. — Vol. 336. — P. 686–687.
13. De la Viuda M., Fille M., Ruiz J., Aslanzadeh J. Use of AmpliWax to optimize amplicon sterilization by isopropyl alcohol // *J. Clin. Microbiol.* — 1996. — Vol. 34. — P. 3115–3119.
14. Deragon J.-M., Sinnott D., Mitchell G., Potier M., Labuda D. Use of γ irradiation to eliminate DNA contamination for PCR // *Nucl. Acids Res.* — 1990. — Vol. 18. — P. 6149.
15. Dohner D.E., Dehner M.S., Gelb L.D. Inhibition of PCR by mineral oil exposed to UV irradiation for prolonged periods // *Biotechniques*. — 1995. — Vol. 18. — P. 964–967.
16. Dwyer D.E., Saksena N. Failure of ultra-violet irradiation and autoclaving to eliminate PCR contamination // *Mol. Cell. Probes*. — 1992. — Vol. 6. — P. 87–88.
17. Eshleman J., Smith D.G. Use of DNase to eliminate contamination in ancient DNA analysis // *Electrophoresis*. — 2001. — Vol. 22(20). — P. 4316–4319.
18. Espy M.J., Smith T.F., Persing D.H. Dependence of polymerase chain reaction product inactivation protocols on amplicon length and sequence composition // *J. Clin. Microbiol.* — 1993. — Vol. 31. — P. 2361–2365.
19. Fairfax M.R., Metcalf M.A., Cone R.W. Slow inactivation of dry PCR templates by UV light // *PCR Methods Appl.* — 1991. — Vol. 1. — P. 142–143.
20. Fetzer C., Pesch S., Ohlinger V.F. High risk of false positive results in a widely used diagnostic test for detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) // *Vet. Microbiol.* — 2006. — Vol. 115. — P. 21–31.
21. Frothingham R., Blitchington R.B., Lee D.H., Greene R.C., Wilson K.H. UV absorption complicates PCR

- decontamination // *Biotechniques*. — 1992. — Vol. 13. — P. 208–210.
22. *Furrer B., Cadrian U., Wieland P., Luthy J.* Improving PCR efficiency // *Nature*. — 1990. — Vol. 346. — P. 324.
 23. *Gibbs R.A., Chamberlain J.S., and Caskey C.T.* / In: *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification* (Ehrlich H.A., ed.). — Stockton Press, New York, 1989. — P. 171–191.
 24. *Gilgen M., Hoefelein C., Luethy J., Huebner Ph.* Hydroxyquinoline overcomes PCR inhibition by UV-damaged mineral oil // *Nucl. Acids Res.* — 1995. — Vol. 23. — P. 4001–4002.
 25. *Glushkov S.A., Bragin A.G., Dymshits G.M.* Decontamination of polymerase chain reaction reagents using DEAE-cellulose // *Anal. Biochem.* — 2009. — Vol. 393. — P. 135–137.
 26. *Goldenberger D., Altwegg M.* Eubacterial PCR: contaminating DNA in primer preparations and its elimination by UV light // *J. Microbiol. Methods*. — 1995. — Vol. 21. — P. 27–32.
 27. *Hanaki K., Nakatake H., Yamamoto K., Odawara T., Yoshikura H.* DNase I activity retained after heat inactivation in standard buffer // *Biotechniques*. — 2000. — Vol. 29(1). — P. 38–40, 42.
 28. *Heininger A., Binder M., Ellinger A., Botzenhart K., Unertl K., Doering G.* DNase pretreatment of master mix reagents improves the validity of universal 16S rRNA gene PCR results // *J. Clin. Microbiol.* — 2003. — Vol. 41. — P. 1763–1765.
 29. *Hilali F., Saulnier P., Chachaty E., Andremont A.* Decontamination of polymerase chain reaction reagents for detection of low concentrations of 16S rRNA genes // *Mol. Biotechnol.* — 1997. — Vol. 7. — P. 207–216.
 30. *Hughes M.S., Beck L.A., Skuce R.A.* Identification and elimination of DNA sequences in Taq DNA polymerase // *J. Clin. Microbiol.* — 1994. — Vol. 32. — P. 2007–2008.
 31. *Isaacs S.T., Tessman J.W., Metchette K.C., Hearst J.E., Cimino G.D.* Post-PCR sterilization: development and application to an HIV-1 diagnostic assay // *Nucl. Acids Res.* — 1991. — Vol. 19. — P. 109–116.
 32. *Jinno Y., Yoshiura K., Niikawa N.* Use of psoralen as extinguisher of contaminated DNA in PCR // *Nucl. Acids Res.* — 1990. — Vol. 18. — P. 6739.
 33. *Kitchin P.A., Szotyori Z., Fromholz C., Almond N.* Avoidance of false positives // *Nature*. — 1990. — Vol. 344. — P. 201.
 34. *Kwok S., Higuchi R.* Avoiding false positives with PCR // *Nature*. — 1989. — Vol. 339. — P. 237–238.
 35. *Lo Y.M., Mehal W.Z., Fleming K.A.* False-positive results and the polymerase chain reaction // *Lancet*. — 1988. — Vol. 2. — P. 679.
 36. *Longo M.C., Berninger M.S., Hartley J.L.* Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions // *Gene*. — 1990. — Vol. 93. — P. 125–128.
 37. *Mohammadi T., Reesink H.W., Vandenbroucke-Grauls C.M., Savelkoul P.H.* Removal of contaminating DNA from commercial nucleic acid extraction kit reagents // *J. Microbiol. Methods*. — 2005. — Vol. 61. — P. 285–288.
 38. *Molloy P.J., Persing D.H., Berardi V.P.* False-positive results of PCR testing for Lyme disease // *Clin. Infect. Dis.* — 2001. — Vol. 33. — P. 412–413.
 39. *Morono Y, Yamamoto K, Inagaki F.* Radical Gas-Based DNA Decontamination for Ultra-Sensitive Molecular Experiments // *Microbes Environ.* — 2012 Apr 18 [Epub ahead of print].
 40. *Ou C.Y., Moore J.L., Schochetman G.* Use of UV irradiation to reduce false positivity in polymerase chain reaction // *Biotechniques*. — 1991. — Vol. 10. — P. 442–446.
 41. *Padua R.A., Parrado A., Larghero J., Chomienne C.* UV and clean air result in contamination-free PCR // *Leukemia*. — 1999. — Vol. 13. — P. 1898–1899.
 42. *Patel R., Grogg K.L., Edwards W.D., Wright A.J., Schwenk N.M.* Death from inappropriate therapy for Lyme disease // *Clin. Infect. Dis.* — 2000. — Vol. 31. — P. 1107–1109.
 43. *Porter-Jordan K., Garrett C.T.* Source of contamination in polymerase chain reaction assay // *Lancet*. — 1990. — Vol. 335. — P. 1220.
 44. *Prince A.M., Andrus L.* PCR: how to kill unwanted DNA // *Biotechniques*. — 1992. — Vol. 12. — P. 358–360.
 45. *Pruvost M., Grange T., Geigl E.-M.* Minimizing DNA contamination by using UNG-coupled quantitative real-time PCR on degraded DNA samples: application to ancient DNA studies // *Biotechniques*. — 2005. — Vol. 38. — P. 569–575.
 46. *Roosendaal R., Kuipers E.J., van den Brule A.J., Pena A.S., Meuwissen S.G., Walboomers J.M., de Graaff J.* Detection of *Helicobacter pylori* DNA by PCR in gastrointestinal equipment // *Lancet*. — 1993. — Vol. 341. — P. 900.
 47. *Rueckert A., Morgan H.W.* Removal of contaminating DNA from polymerase chain reaction using ethidium monoazide // *J. Microbiol. Methods*. — 2007. — Vol. 68. — P. 596–600.
 48. *Rys P.N., Persing D.H.* Preventing false positives: quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products // *J. Clin. Microbiol.* — 1993. — Vol. 31. — P. 2356–2360.
 49. *Sarkar G., Sommer S.* More light on PCR contamination // *Nature*. — 1990. — Vol. 347. — P. 340–341.
 50. *Sarkar G., Sommer S.S.* Parameters affecting susceptibility of PCR contamination to UV inactivation // *Biotechniques*. — 1991. — Vol. 10. — P. 590–594.
 51. *Schmidt T., Hummel S., Herrmann B.* Evidence of contamination in PCR laboratory disposables // *Naturwissenschaften*. — 1995. — Vol. 82. — P. 423–431.
 52. *Schmidt T.M., Pace B., Pace N.R.* Detection of DNA contamination in Taq polymerase // *Biotechniques*. — 1991. — Vol. 11. — P. 176–177.

53. *Silkie S.S., Tolcher M.P., Nelson K.L.* Reagent decontamination to eliminate false-positives in *Escherichia coli* qPCR // *J. Microbiol. Methods.* – 2008. – Vol. 72. – P. 275–282.
54. *Spangler R., Goddard N.L., Thaler D.S.* Optimizing Taq polymerase concentration for improved signal-to-noise in the broad range detection of low abundance bacteria // *PLoS One.* – 2009. – Vol. 4(9). – P. e7010.
55. *Tamariz J., Vojnarovska K., Prinz M., Caragine T.* The application of ultraviolet irradiation to exogenous sources of DNA in plasticware and water for the amplification of low copy number DNA // *J. Forensic. Sci.* – 2006. – Vol. 51. – P. 790–794.
56. *Thornton C.G., Hartley J.L., Rashtchain A.* Utilizing uracil DNA glycosylase to control carryover contamination in PCR: characterization of residual UDG activity following thermal cycling // *Biotechniques.* – 1992. – Vol. 13. – P. 180–182.
57. *Urban C., Gruber F., Kundi M., Falkner F.G., Dorner F., Haemmerle T.* A systematic and quantitative analysis of PCR template contamination // *J. Forensic. Sci.* – 2000. – Vol. 45. – P. 1307–1311.
58. *Varanat M., Maggi R.G., Linder K.E., Horton S., Breitschwerdt E.B.* Cross-contamination in the molecular detection of *Bartonella* from paraffin-embedded tissues // *Vet. Pathol.* – 2009. – Vol. 46. – P. 940–944.
59. *Victor T., Jordaan A., du Toit R., Van Helden P.D.* Laboratory experience and guidelines for avoiding false positive polymerase chain reaction results // *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* – 1993. – Vol. 31. – P. 531–535.
60. *Wages J.M. Jr., Cai D., Fowler A.K.* Removal of contaminating DNA from PCR reagents by ultrafiltration // *Biotechniques.* – 1994. – Vol. 16. – P. 1014–1017.
61. *Walder R.Y., Hayes J.R., Walder J.A.* Use of PCR primers containing a 3' terminal ribose residue to prevent cross-contamination of amplified sequences // *Nucl. Acids Res.* – 1993. – Vol. 21. – P. 4339–4343.
62. *Witt N., Rodger G., Vandesompele J., Benes V., Zumla A., Rook G.A., Huggett J.F.* An assessment of air as a source of DNA contamination encountered when performing PCR // *J. Biomol. Tech.* – 2009. – Vol. 20. – P. 236–240.
63. *Wollants E., Van Ranst M.* Detection of false positives with a commonly used Norovirus RT-PCR primer set // *J. Clin. Virol.* – 2012 [ahead of print, art nr S386-6532(12)00354-X].
64. *Zhu Y.S., Isaacs S.T., Cimino G. D., Hearst J.E.* The use of exonuclease III for polymerase chain reaction sterilization // *Nucl. Acids Res.* – 1991. – Vol. 19. – P. 2511.

HOW TO AVOID THE APPEARANCE OF FALSE-POSITIVE RESULTS IN A POLYMERASE CHAIN REACTION?

A.V. CHEMERIS, E.G. MAGDANOV, R.R. GARAFUTDINOV, V.A. VAKHITOV

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, RAS, Ufa, Russia

In a review article on the big material discusses the causes of false-positive results in the implementation of PCR. The basic ways of DNA contamination, methods of its prevention and elimination are analyzed.

Keywords: PCR, false-positive PCR, amplicon, post-PCR sterilization, pre-PCR sterilization, contamination, decontamination, contaminating DNA, ancient DNA, DNase, UV light, psoralen, uracil-DNA glycosylase, DNA forensics.

О КОМПЛЕКСНОЙ ПРОГРАММЕ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ НА ПЕРИОД ДО 2020 ГОДА («БИО-2020»)

Р.Г. ВАСИЛОВ^{1*}, В.И. ТРУБНИКОВ²

¹ *Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова,*

² *Союз предприятий биотехнологической отрасли, Москва*

Дается информация о недавно принятой Правительством Российской Федерации Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года («БИО-2020»). Рассматриваются исторические, научно-методологические, правовые, экономические и организационные аспекты создания и реализации этой программы.

Ключевые слова: биотехнология, теория, методология, практика, государственная комплексная программа.

Введение

24 апреля 2012 года Правительством Российской Федерации была принята «Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года» (или сокращенно — «БИО-2020»). Документ был подписан В.В. Путиным в бытность его премьер-министром Правительства РФ. Эта важная дата в развитии отечественной биотехнологии требует оценки и анализа в плане исторической преемственности и перспективности.

1990-е годы для Российской Федерации характеризовались снижением научной и производственной активности, что привело к утрате передовых позиций, которые занимала наша страна в ряде приоритетных областей, включая биотехнологию.

Между тем предшествующие годы были периодом подъема биотехнологии по всем направлениям: теории, методологии, практики, в том числе и подготовки соответствующих кадров. Это во многом было связано с именем и делами вице-президента АН СССР, академика Юрия Анатольевича Овчинникова (1934–1988) (рис. 1). Биотехнология в те годы переживала бум. На Западе это было обусловлено беспрецедентными успехами в молекулярной биологии, увенчанными чередой Нобелевских премий.



Рис. 1. Академик АН СССР Ю.А. Овчинников (1934–1988).

Открытие двойной спирали ДНК, расшифровка генетического кода, обнаружение обратной транскрипции, наконец, демонстрация возможности создания рекомбинантной ДНК, то есть реального пути к геной инженерии, — все это стало базой для успешного старта в 1970–1980-е годы использования этих достижений в практической деятельности, например, сельском хозяйстве, медицине. Данную ситуацию хорошо осознавали научные лидеры молекулярной биологии СССР тех лет — В.А. Энгельгардт, А.А. Баев, Ю.А. Овчинников и другие известные специалисты. Именно благодаря их глубоким научным исследованиям в биохимии и молекулярной генетике, авторитету и волевым действиям руководство страны признало целесообразным поддержать биотехнологию. Так уж случилось, что на острие этого

© 2012 г. Василов Р.Г., Трубников В.И.

* **Автор для переписки:**

Василов Раиф Гаянович

доктор биологических наук, профессор,

президент Общества биотехнологов России

им. Ю.А. Овчинникова

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

сверхактуального научно-практического направления оказался Ю.А. Овчинников — и по должности вице-президента «большой» академии, и по своим научным убеждениям, и по своим экстраординарным организационным способностям.

Для того чтобы оценить вклад Ю.А. Овчинникова в развитие молекулярной биологии вообще и биотехнологии, в частности, надо понять ту историческую эпоху, в которой он жил. Для этого мало было являться хорошим ученым, исследователем или педагогом. Нужно было доказать самым высоким инстанциям, что требуется вложение гигантских средств для поддержки именно того научного направления, на которое он указывал. И этого он добивался. Результат — три постановления ЦК КПСС и Правительства СССР о развитии молекулярной биологии в 1970–1980-х годах. За каждым постановлением следовало выделение больших финансовых средств, строились новые научно-исследовательские институты в разных точках Советского Союза, в том числе и в союзных республиках, где они до сих пор функционируют. Закупалась дорогостоящая импортная техника, готовились сотни квалифицированных кадров. Сам Юрий Анатольевич, кроме ключевого поста вице-президента АН СССР, входил в руководящие структуры, специально занимавшиеся координацией генно-инженерных и биотехнологических исследований. С 1974 по 1988 гг. он был председателем межведомственного научно-технического совета по проблемам физико-химической биологии и биотехнологии при ГКНТ СССР и Президиуме АН СССР. Кроме того, он создал и возглавил межотраслевой научно-технический комплекс «Биоген», который наладил выпуск биоинженерных продуктов — интерферонов, гормона роста и др.

Вот названия только трех работ Ю.А. Овчинникова 1980-х годов: «Биотехнология и ее место в научно-техническом прогрессе» (1982), «Биология и биотехнология: Достижения и прогнозы. В кн.: Будущее науки» (1985), «Биотехнология — промышленный переворот XXI века» (1986) [11–13]. Из них становится ясным, сколь высоко оценивал ученый перспективность биотехнологии в мировом научно-техническом прогрессе.

Мы далеки от мысли абсолютизировать роль Ю.А. Овчинникова в обеспечении развития биотехнологии в нашей стране (да и не только у нас, но и на Кубе, где до сих пор созданная им в 1980-е годы биотехнологическая база живет и процветает) и приписывать ему лично все заслуги в этой области. Здесь трудилось много достойных, уважаемых людей, высоких профессионалов и патриотов

— В.Д. Беляев, Л.С. Сандахчиев, А.А. Воробьев, И.Н. Блохина, С.И. Алиханян, ныне здравствующие В.А. Быков, В.Г. Дебабов и др., имена которых хорошо помнят и ныне занятые в биотехнологии специалисты.

Переходя от описания фазы расцвета биотехнологии в нашем государстве, переступив через тяжелые 1990-е гг., надо отметить, что в 2000-е годы благодаря консолидированным усилиям государства, общества и бизнес-структур было достигнуто понимание того, что требуются срочные меры по возрождению и ускоренному развитию отечественной биотехнологии.



Рис. 2. Академик РАМН, генерал-майор м/с А.А. Воробьев (1923–2006)

Исторически сложилось так, что первичная инициатива была генерирована общественными организациями, в первую очередь, сформированным в 2003 году Обществом биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР). ОБР сразу же объявило своей главной целью создание специальной программы федерального уровня по биотехнологии, функционирующей по принципу государственно-частного партнерства. Особенно важно в той ситуации было то, что Общество биотехнологов России возглавил его президент Воробьев Анатолий Андреевич (1923–2006) — академик РАМН, генерал-майор медицинской службы, человек, много сделавший в советский период для развития промышленной биотехнологии в нашей стране (Рис. 2).

Предшественники Комплексной программы «БИО-2020»

В рамках данной статьи не представляется возможным подробно останавливаться на всех аспектах

деятельности ОБР и его роли в повышении внимания государства и общества к проблемам развития биотехнологии. Однако в контексте обсуждаемой темы — госпрограммы по биотехнологии — требуется дать некоторые разъяснения.

Второй съезд Общества биотехнологов России 15 октября 2004 года принял решение о формировании Национальной программы по биотехнологии и поручил это специально созданной рабочей группе, а уже к лету 2005 г. ее проект был обсужден и поддержан Союзом предприятий биотехнологической отрасли (решение общего собрания от 29 июня 2005 г.) и одобрен Экспертным советом по биотехнологической промышленности при Комитете по промышленности, строительству и наукоемким технологиям Государственной Думы ФС РФ (протокол № 3 от 11 октября 2005 г.). После дальнейшего обсуждения и редакционной доработки документ под названием «Национальная программа «Развитие биотехнологии в Российской Федерации на 2006—2015 гг.» был утвержден Третьим съездом Общества биотехнологов России 27 октября 2005 г. (рис. 3) [6, 18].

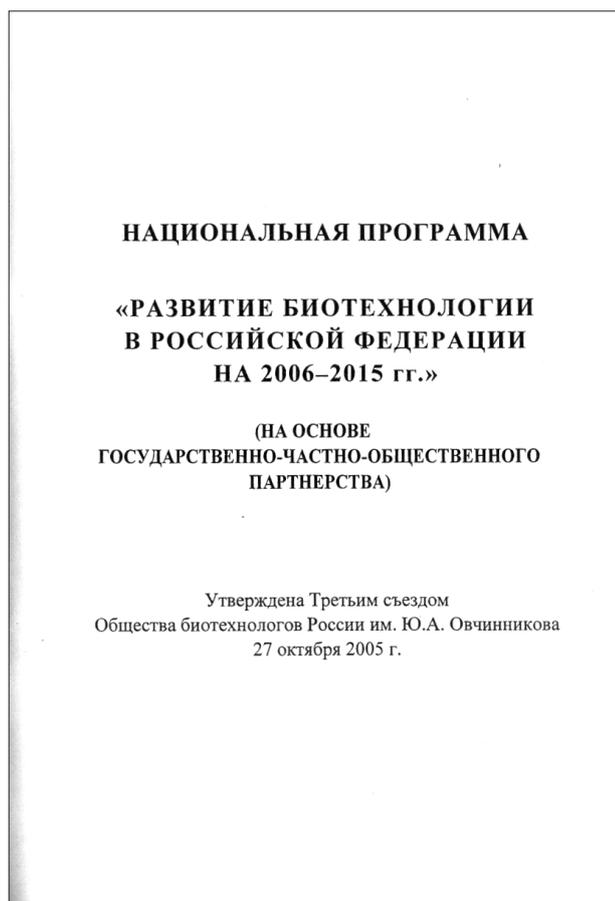


Рис. 3. Титульный лист Национальной программы «Развитие биотехнологии в Российской Федерации на 2006—2015 гг.»

Это был первый системный и комплексный документ по развитию биотехнологии в нашей стране после распада СССР. Структурно Программа представляла собой вариант типовой федеральной целевой программы, оформленной в соответствии с требованиями Минобрнауки России. Она характеризовалась полным охватом проблем, связанных с развитием теории, методологии и практики биотехнологии в Российской Федерации [6, 18]. Однако отличительной ее особенностью являлось ранжирование проектов по следующим группам:

- Национальные приоритетные проекты.
- Федеральные проекты.
- Региональные (межрегиональные, окружные) проекты (программы).
- Целевые проекты (внебюджетные, международные и иные проекты).

Кроме того, по механизму реализации Программа основывалась на механизме государственно-частного партнерства.

Что интересно, в указанной Программе 2005 года есть ряд элементов по форме и содержанию, которые в том или ином качестве, в измененном или неизменном виде вошли в Комплексную программу 2012 года «БИО-2020». Здесь и разделение практических мер на 10 основных направлений, и определение как приоритетов высшего уровня национальных биологических ресурсов, развертывание работ по биотопливу и т.д. Это объясняется тем, что текст Программы ОБР за 7-летний период дошел до большинства специалистов, соприкасавшихся с проблемами биотехнологии: и управленцев, и ученых, и предпринимателей. Следует отметить, что Национальная программа включала в себя и такой важный пункт, как формирование федеральной целевой программы «Приоритетные научно-практические направления биотехнологии (2009—2015 гг.)» (Раздел 2.10. Программы). Таким образом, было заранее предусмотрено создание программы федерального уровня в перспективе, хотя она была утверждена со сдвигом в 3 года (в 2011 году было вынесено решение о ее формировании, а в 2012 г. она была принята в виде рассматриваемой нами Комплексной программы «БИО-2020»).

Оказали влияние на концепцию и структуру государственной программы 2012 года и иные последующие документы, подготовленные ОБР (в особенности это касается Стратегии развития биотехнологической отрасли промышленности Российской Федерации до 2020 года — см. ниже), равно как и деятельность ОБР в целом, в том числе и постоянное внимание к этой теме со стороны нашего журнала [1—7].

Действительно, Национальная программа была представлена Правительству Российской Федерации, профильным министерствам и ведомствам, руководителям всех субъектов РФ, государственным академиям (РАН, РАМН, РАСХН), профильным НИИ, вузам, заинтересованным общественным организациям, видным ученым и производителям. Программа была несколько раз переиздана и была доведена до сведения широкого круга специалистов. Реакция на нее в целом была положительной, однако в органах исполнительной государственной власти федерального уровня она не получила официальной поддержки. Все-таки надо отметить, что во многие решения федеральной исполнительной власти термин «биотехнология» формально включался в 2000-е годы, в том числе в перечень критических технологий Минобрнауки России, и т.д.

Хотя законодательная власть в лице Государственной Думы ФС РФ на протяжении последних десяти лет оказывала всемерную поддержку биотехнологическому направлению, организовав ряд парламентских слушаний (2009, 2012) и круглых столов (2005, 2011, 2012) по нормативно-правовому обеспечению данной отрасли [8, 17].

Тем не менее в ряде регионов РФ идеи Национальной программы получили отклик и под непосредственным патронатом Общества биотехнологов России и Союза предприятий биотехнологической отрасли были сформированы соответствующие региональные программы по биотехнологии (везде была оказана поддержка со стороны руководства субъектов РФ). Это касается, прежде всего, Республики Татарстан и Чувашской Республики, где программы были утверждены руководителями правительств республик в 2010 г. [15, 16]. Правда, чувашские специалисты в самый последний момент перед утверждением переименовали свою региональную программу в «Стратегию» (в подражание только что появившемуся, разработанному ОБР и Союзом биотехнологов документу федерального уровня «Стратегия «БИО-2020» — см. ниже). В других субъектах РФ также ведется работа по созданию своих региональных биотехнологических программ (Кировская и Нижегородская области, Республика Башкортостан, Алтайский край).

Следующей базовой вехой в выработке четкого направления развития отечественной биотехнологии стала подготовка ОБР особого документа «Стратегия развития биотехнологической отрасли промышленности Российской Федерации до 2020 года» (сокращенно — «Стратегия БИО-2020»), идеологической основой которого послужила «Концепция долгосрочного социально-экономического развития Российской Федерации до

2020 года», утвержденная распоряжением Правительства Российской Федерации 17 ноября 2008 г. № 1662-р. [10], или, как ее чаще называют, «Стратегия-2020».

«Стратегия БИО-2020» подробно рассматривалась нами в предыдущей публикации [5]. Она была тщательно обсуждена в течение двух лет многочисленными экспертами, была выставлена на сайте ОБР www.biorosinfo.ru [18] и в конце 2010 года после обсуждения на собрании Союза предприятий биотехнологической отрасли была утверждена Центральным Правлением Общества биотехнологов России. В плане настоящей статьи требуется пояснить, что этот преемственный документ, развивающий идеи и принципы Национальной программы ОБР образца 2005 года, также получил признание у специалистов, особенно после напечатания в ясном, доходчивом формате и достаточным тиражом (рис. 4) [14].

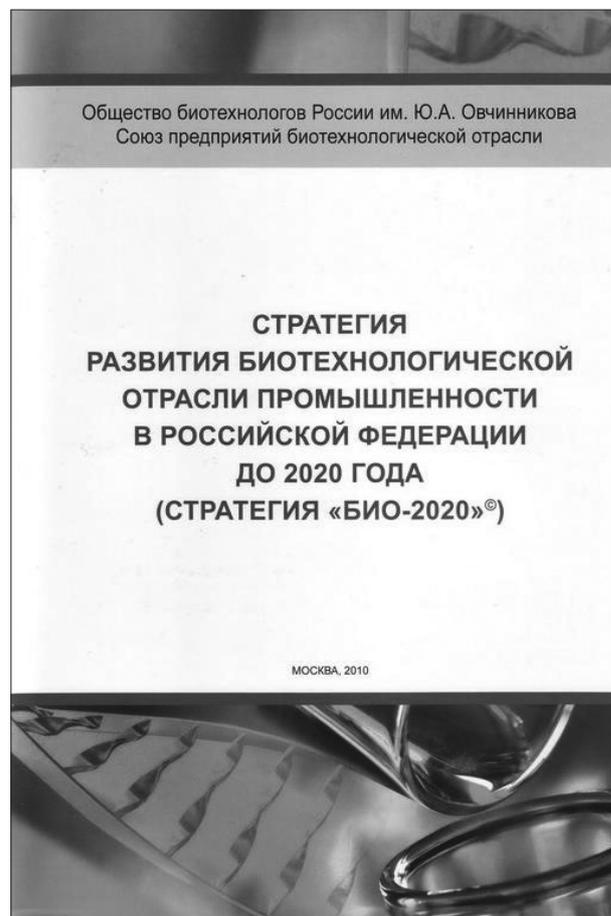


Рис. 4. Обложка издания «Стратегии «БИО-2020»

Стратегия «БИО-2020», как говорится, легла на стол многим заинтересованным лицам и весьма пригодилась при разработке Комплексной программы «БИО-2020». Кстати, решение о разработке указанной Программы было принято 1 апреля 2011 года

на уровне Правительства РФ. Начиная с этой даты, под патронатом Минэкономки России начался процесс формирования данной программы. Была создана комиссия из известных специалистов биотехнологического профиля, в состав которой вошел один из авторов настоящей статьи, который мог представлять интересы ОБР и Союза биотехнологов и влиять на содержание подготавливаемого текста. В распоряжении комиссии оказался ряд исходных документов, в числе которых была и «Стратегия БИО-2020». Довольно символично, что в окончательное наименование государственной комплексной программы вошел логотип «БИО-2020», родившийся в недрах десятилетней творческой работы Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова. К тому же ряд блоков «Стратегии «БИО-2020» вошел в Комплексную программу «БИО-2020» (например, уже упоминавшаяся нами рубрикация на 10 направлений, их терминологическое определение — «лесная», «морская», «пищевая» биотехнология и т.д.; внедрение понятия «биоэкономика» и др.). По нашему предложению также включен в Программу (Приложение № 1, с. 57–65) из материалов ОБР словарь терминов (глоссарий) [4].

Надо указать на то, что комиссия по разработке государственной комплексной программы работала не только со «Стратегией БИО-2020», но и имела в своем распоряжении другие документы, в частности, тексты технологических платформ по биоэнергетике, медицине будущего и «Биотех-2030». Все это вместе взятое наряду с интенсивной работой комиссии и руководства Минэкономки России позволило в течение года сформировать программу, утвержденную, как уже говорилось, в конце апреля 2012 г. В.В. Путиным перед вступлением в должность Президента Российской Федерации.

Концепция и структура Комплексной программы «БИО-2020»

Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года («БИО-2020») представляет собой текстовый документ, размещенный на сайте Минэкономки России (http://www.economy.gov.ru/minec/activity/sections/innovations/development/doc20120427_06) (рис. 5) [9].

Нет необходимости подробно пересказывать содержание этой Программы, однако целесообразно привести ряд обобщенных тезисов и презентаций, которые достаточно отражают ее целевые установки и программные мероприятия.

Цель Программы — создание в России высокотехнологичного сектора биоэкономики, который наряду с микроиндустрией и индустрией информационных технологий должен стать базой построения постиндустриальной экономики в стране.

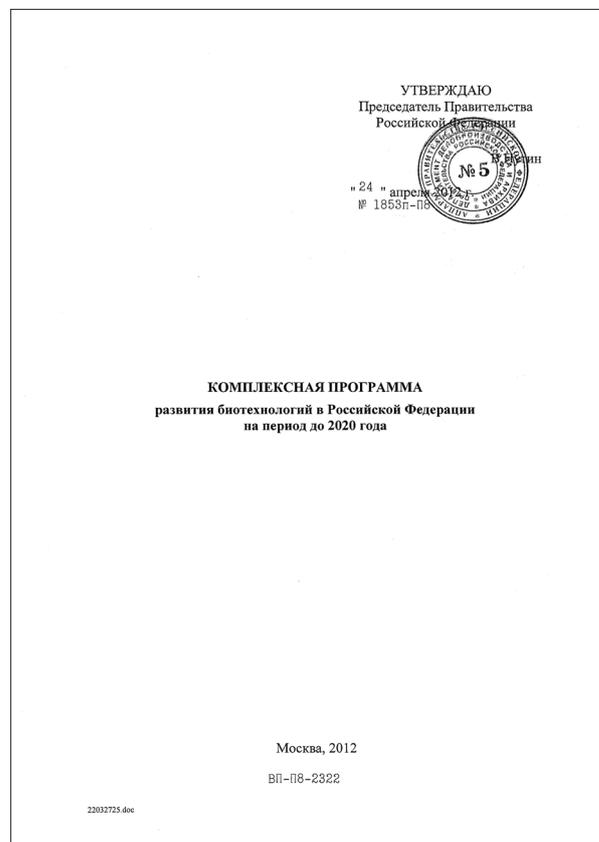


Рис. 5. Титульный лист Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года» («БИО-2020») [9]

Основные направления Комплексной программы «БИО-2020»:

- медицинская биотехнология;
- промышленная биотехнология;
- биоэнергетика;
- сельскохозяйственная биотехнология;
- пищевая биотехнология;
- лесная биотехнология;
- природоохранная (экологическая) биотехнология;
- морская биотехнология.

Общий бюджет Программы «БИО-2020» составляет на весь период 1078 млрд. руб., из них приходится на: биоэнергетику — 31%; промышленную биотехнологию — 18%; агробио- и пищевую биотехнологию — 17%; биомедицину — 13%; биофарму — 9%; аквабиотехнологию — 6%; лесную биотехнологию — 4%; экобиотехнологию — 2%.

Ведущим механизмом реализации программы является государственно-частное партнерство — как инструмент эффективного, взаимодополняющего сотрудничества государственных, общественных и бизнес-структур.

При этом подразумевается максимальное использование других механизмов: 1) государственные целевые программы в сфере биотехнологии; 2) создаваемые технологические платформы — «Биотех-2030», «Биоэнергетика», «Медицина будущего»; 3) международные программы (СНГ, ЕврАзЭС и др.).

Ожидаемые результаты реализации Программы «БИО-2020»:

- Увеличение в 8,3 раза объема потребления биотехнологической продукции в Российской Федерации.
- Увеличение объема производства биотехнологической продукции в Российской Федерации в 33 раза.
- Сокращение доли импорта в потреблении биотехнологической продукции на 50%.
- Увеличение доли экспорта в производстве биотехнологической продукции более чем в 25 раз.
- Выход на уровень производства биотехнологической продукции в России в размере около 1% ВВП к 2020 году и создание условий для достижения сектором объемов не менее 3% ВВП к 2030 г.
- Формирование полноценной структуры биоэкономики.
- Формирование новых рынков: биополимеры, биоразлагаемые материалы, биотопливо.
- Обеспечение за счет биотехнологии: 30% рынка упаковочных материалов, переработки 10% с/х отходов и 30% отходов пищевых производств.

Для оценки эффективности Программы вводятся следующие интегральные целевые показатели, представленные в таблице 1.

Таблица 1

Целевые показатели Программы «БИО-2020»

Показатель решения задач Программы	Ед. изм.	2010	2015	2020
Объем потребления биотехнологической продукции в России	млрд. руб.	120	400	1000
Объем производства биотехнологической продукции в России	млрд. руб.	24	200	800
Доля импорта в потреблении	%	80	60	40
Доля экспорта в производстве	%	<1	20	25

Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года по форме и содержанию отличается от традиционных федеральных целевых программ. В связи с этим в тексте Программы подробно изложены вопросы управления ее реализацией. Координатором Программы является Министерство экономического развития Российской Федерации, которое в пределах своих полномочий совместно с иными федеральными и региональными органами исполнительной власти, заинтересованными организациями, в том числе — участниками технологических платформ, осуществляет необходимые действия по ее формированию и реализации.

Ответственными исполнителями Программы по основным направлениям являются федеральные органы исполнительной власти: Минобрнауки России, Минпромторг России, Минсельхоз России, Минприроды России, Минздравсоцразвития России, Минэнерго России, Минрегион России, Рослесхоз, Росрыболовство.

Координатор Программы формирует межведомственный совет, в задачу которого входит определение стратегических направлений развития биоэкономики в стране. Кроме того, образуется совещательный орган — координационно-коллегиальный орган Программы, то есть рабочая группа по биотехнологиям Правительственной комиссии по высоким технологиям и инновациям. Основные задачи рабочей группы состоят в предварительной подготовке, рассмотрении и экспертной оценке предложений в области биотехнологий.

В Программе изложены основные функции ее координатора по организационным вопросам.

Таким образом, формирование указанной государственной программы развития отечественной биотехнологии на период до 2020 года является знаковым событием в масштабах страны, которое обеспечит приоритетную поддержку данного актуального направления.

Литература

1. Василев Р.Г. Биотехнология как национальный приоритет России на ближайшую и отдаленную перспективу // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2006. — Т. 2. — № 4. — С. 24–25.
2. Василев Р.Г. Биоэкономика как следующий шаг развития — шанс для России // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2008. — Т. 4. — № 1. — С. 28–32.
3. Василев Р.Г. Развитие биотехнологии — стратегический приоритет России // Вестник биотехнологии и физико-

- химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2010. — Т. 6. — № 1. — С. 56–58.
4. Васильев Р.Г., Мезенова О.Я. Примерный краткий глоссарий по биотехнологии // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2008. — Т. 4. — № 3. — С. 5–15.
 5. Васильев Р.Г., Трубников В.И. О стратегии развития биотехнологической отрасли промышленности Российской Федерации до 2020 года // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2010. — Т. 6. — № 4. — С. 26–34.
 6. Воробьев А.А., Васильев Р.Г. Концепция, структура и механизмы реализации Национальной программы «Развитие биотехнологии в Российской Федерации на 2006–2015 гг.» // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2005. — Т. 1. — № 1. — С. 56–58.
 7. Воробьев А.А., Евстигнеев В.И., Пименов Е.В., Васильев Р.Г., Кутырев В.В. Концепция создания международной коалиционной программы по биобезопасности // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2006. — Т. 2. — № 2. — С. 50–53.
 8. Законодательное обеспечение развития биотехнологической отрасли промышленности: Материалы круглого стола в Государственной Думе РФ. 8 февраля 2005 г. — М.: «Русская панорама», 2005. — 144 с.
 9. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года («БИО-2020») [Электронный ресурс]: http://www.economy.gov.ru/mines/activity/sections/innovations/development/doc20120427_06 (дата обращения — 07.10.2012).
 10. Концепция долгосрочного социально-экономического развития Российской Федерации до 2020 года. Утверждена распоряжением Правительства Российской Федерации 17 ноября 2008 г. № 1662-р.
 11. Овчинников Ю.А. Биология и биотехнология: достижения и прогнозы / В кн.: Будущее науки: Межд. ежегодн. — М.: Знание, 1985. — Вып. 18. — С. 10–21.
 12. Овчинников Ю.А. Биотехнология — промышленный переворот XX века / В сб.: Вам жить в XXI веке. Сост. Г.А. Юркина. — М., 1986. — С. 13–21.
 13. Овчинников Ю.А. Биотехнология и ее место в научно-техническом прогрессе // Вестник АН СССР. — 1982. — № 4. — С. 4–17.
 14. Стратегия «БИО-2020». — М., 2010 (см. также сайт ОБР www.biorosinfo.ru).
 15. Стратегия «Чувашия — биорегион» до 2020 года. — Чебоксары, 2010. — 165 с.
 16. Целевая программа «Развитие биотехнологии в Республике Татарстан на 2010–2020 годы». — Казань, 2009. — 184 с.
 17. Часть вторая. Материалы «круглого стола» на тему «О совершенствовании законодательного обеспечения сохранения биологических коллекций для развития биотехнологической отрасли Российской Федерации». Москва, Государственная Дума, 9 июня 2011 года / В кн.: Вопросы правового обеспечения научно-технической и инновационной деятельности. Информационно-аналитический сборник по материалам выездного расширенного заседания и «круглого стола». — М.: Издание Государственной Думы, 2011. — С. 105–180.
 18. www.biorosinfo.ru.

ON THE COMPLEX PROGRAM OF BIOTECHNOLOGY IN THE RUSSIAN FEDERATION UP TO 2020 («BIO-2020»)

R.G. VASILOV¹, V.I. TRUBNIKOV²

¹ Yu.A. Ovchinnikov Russian Biotechnology Society;

² Russian Biotechnology Association, Moscow, Russia

Provides information on recently adopted by the Government of the Russian Federation of the Complex Program of biotechnology development in the Russian Federation for the period up to 2020 («BIO-2020»). The historical, scientific, methodological, legal, economic and organizational aspects of the development and implementation of this program are considered.

Keywords: biotechnology, theory, methodology, practice, state complex program.

ПРОБЛЕМЫ И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Б.В. АФАНАСЬЕВ*

*Институт детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой,
ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»,
Санкт-Петербург*

Анализируется современное состояние проблемы трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в Российской Федерации. Даются предложения по развитию инфраструктуры, связанной с трансплантацией костного мозга, в крупных медицинских учреждениях, прежде всего, в университетских клиниках, для обеспечения неразрывных направлений: клиника, наука, подготовка высококвалифицированных кадров в этой области.

Ключевые слова: биомедицинские клеточные технологии, гемопоэтические стволовые клетки.

В последние годы на основе клеточной и молекулярной биологии, иммунологии, генетики и клинической трансплантологии сформировались приоритетные направления — клеточные и генные биомедицинские технологии, в рамках которых разрабатываются новые перспективные методы терапии многих социально значимых заболеваний, таких как заболевания сердечно-сосудистой и центральной нервной систем, онкологические, гематологические, аутоиммунные, эндокринные и наследственные болезни. То есть, в медицине создается единое направление использования трансплантационных, клеточных и генных технологий в лечении целого ряда заболеваний.

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является классическим примером применения клеточной терапии в лечении многих злокачественных, гематологических и наследственных заболеваний. Терапевтический эффект ТГСК обусловлен введением пациенту здоровых гемопоэтических стволовых клеток с целью замещения патологической кроветворной ткани.

В течение последних 40 лет, с момента проведения первой аллогенной ТГСК ребенку в 1968 году (США), количество трансплантаций в мире неуклонно растет и теперь, по данным Международного регистра CIBMTR (Center for International Blood and Marrow Transplant Research), достигает около 60000 трансплантаций в год. В Европе в 2010 году выполнено 33360 различного вида трансплантаций, в РФ — около 700 (2% от общего количества).

В Российской Федерации первые трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от аллогенного донора были проведены в конце 80-х — начале 90-х годов XX века в Москве и Санкт-Петербурге (в 1990 г. первая в СССР аллогенная ТГСК ребенку). Тем не менее до настоящего времени в РФ имеется явное отставание по числу выполняемых ТГСК на 10 млн. населения: в ведущих странах Европы и США этот показатель равен 400–700 трансплантацией в год, в РФ — 44 трансплантации (2009 г.).

Создание клиник трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в России уменьшило отставание в этой области, однако их открытие не решило проблему своевременного проведения трансплантации для большинства пациентов. Факторами, ограничивающими широкое применение ТГСК в РФ, является отсутствие доступности при получении трансплантата гемопоэтических стволовых клеток, что обусловлено несколькими причинами. Источником этих клеток может быть костный мозг, периферическая кровь, пуповинная кровь. Трансплантат может быть получен

© 2012 г. Афанасьев Б.В.

* **Автор для переписки:**

Афанасьев Борис Владимирович

д.м.н., профессор

директор Института детской гематологии и трансплантологии им.

Р.М. Горбачевой, зав. кафедрой гематологии, трансфузиологии и

трансплантологии Санкт-Петербургского государственного меди-

цинского университета им. академика И.П. Павлова

197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8

от совместимого по генам системы-НЛА родственного донора (как правило, сиблинга), а в случае его отсутствия общепринятой тактикой является поиск донора в международной базе данных (регистре), включающей в себя информацию о потенциальных неродственных донорах. Ввиду наличия общей тенденции к снижению рождаемости, как в мире, так и в РФ, подбор родственного донора гемопоэтических клеток существенно ограничен и только 25–30% больных в мире (10–20% больных в РФ) при показаниях к аллогенной ТГСК имеют совместимого родственного донора.

В связи с этим основным направлением стало развитие баз данных (регистров) неродственных доноров гемопоэтических клеток. В настоящее время в мире насчитывается около 50 регистров, расположенных более чем в 30 странах и объединенных во Всемирную ассоциацию доноров гемопоэтических клеток (World Marrow Donors Association – WMDA) с общим числом потенциальных доноров более 20 млн., которое ежегодно неуклонно увеличивается. Все регистры тесно связаны между собой на условиях полной конфиденциальности хранимой информации о донорах, составляя, таким образом, общемировую базу данных, достаточную для поиска совместимого неродственного донора для 85% пациентов, проживающих в ведущих странах Европы и США.

Сейчас во всем мире активно ведутся работы по расширению национальных регистров доноров гемопоэтических стволовых клеток, в том числе банков пуповинной крови (анонимных). Возможность нахождения совместимого донора гемопоэтических клеток для аллогенной трансплантации напрямую зависит от соответствия этнического состава потенциальных доноров генотипическим характеристикам пациентов. Составы всех национальных регистров отражают национальные особенности страны, что особенно актуально для многонационального состава населения РФ. Отсутствие этого соответствия международной базе данных приближает к 40% неэффективность поиска неродственного донора для пациентов РФ, что подтверждается наличием данных об особенностях частоты встречаемости основных гаплотипов НЛА-антигенов доноров РФ (исследование выполнено в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» – ГОУ ВПО СПбГМУ). Помимо этого, поиск и получение гемопоэтических стволовых клеток донора из зарубежных регистров является дорогостоящей процедурой и требует

суммы от 15 до 30 тысяч евро, или 40–50 тысяч долларов США.

В РФ программа по выполнению аллогенной трансплантации от неродственных доноров впервые была начата в 2000 году в клинике трансплантации костного мозга ГОУ ВПО СПбГМУ. Открытие в 2007 г. в составе университета Института детской гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой (ИДГиТ) позволило существенно увеличить количество выполняемых трансплантаций, что практически прекратило поток обращений для выезда пациентов за рубеж. За это время в клинике проведено более 1400 трансплантаций (из них около 300 от родственного и 400 от неродственного доноров, все из зарубежных регистров) у детей, подростков и взрослых из различных регионов РФ.

Необходимо отметить, что ныне разрабатывается и близок к широкому применению метод аллогенной ТГСК от гаплоидентичного донора, что существенно расширит возможности применения данного метода лечения. Внедрение аллогенной ТГСК от гаплоидентичного донора уменьшит потенциальную зависимость от совместимого родственного и неродственного доноров, поскольку в этом случае ГСК могут быть получены от совместимых по одному гаплотипу членов семьи пациента (родители, братья, сестры и т.д.).

Таким образом, на основании проведенного анализа можно предложить следующий проект рекомендаций в контексте обсуждаемого проекта федерального закона о биомедицинских клеточных технологиях:

- Трансплантация костного мозга (гемопоэтических стволовых клеток) является эффективной технологией лечения, востребованной российским здравоохранением.
- Необходимо параллельное развитие всей инфраструктуры, связанной с трансплантацией костного мозга, в крупных медицинских учреждениях, прежде всего, в университетских клиниках, для обеспечения неразрывных направлений: клиника, наука, подготовка высококвалифицированных кадров в этой области.

Важнейшими компонентами такой инфраструктуры должны быть:

- уровень развития онкологической и гематологической службы;
- наличие стандартов диагностики и лечения;
- развитие современной службы переливания крови;
- создание регистра доноров костного мозга (желательно в рамках таможенного союза: Белоруссия – Россия – Казахстан);
- окончательное решение проблем с оформлением таможенной декларации для свободной транспор-

- тировки гемопоэтических стволовых клеток через государственную границу Российской Федерации;
- организация общественных банков типированной пуповиной крови;
 - открытие пансионатов и гостиниц при федеральных медицинских учреждениях;
 - улучшение материально-технической базы с переходом на дифференцированное финансирование в

зависимости от степени сложности трансплантации костного мозга.

Материалы выступления на круглом столе в Государственной Думе ФС РФ на тему «О совершенствовании законодательного обеспечения развития биомедицинских клеточных технологий в Российской Федерации» (Москва, 26 апреля 2012 г.).

PROBLEM AND THE CURRENT STATE OF HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN THE RUSSIAN FEDERATION

B.V. AFANASYEV

*R.M. Gorbacheva Institute of Pediatric Hematology and Transplantology,
Acad. I.P. Pavlov St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg*

Examines the current state of hematopoietic stem cell transplantation in the Russian Federation. We give proposals for the development of infrastructure related to bone marrow transplantation in major medical institutions, especially in university hospitals, to ensure non-breaking areas: clinical, research, training of highly qualified personnel in the field.

Keywords: biomedical cell technologies, hematopoietic stem cells.

ОПЫТ МЕДИЦИНСКОГО РАДИОЛОГИЧЕСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА МИНЗДРАВА РОССИИ В ОБЛАСТИ БИМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО НОРМАТИВНО-ПРАВОВОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ ТАКИХ РАБОТ И ПО ВОПРОСУ ИХ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ПОДДЕРЖКИ

А.Г. КОНОПЛЯНИКОВ*, М.А. КАПЛАН, А.Ф. ЦЫБ

ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Минздрава России, Обнинск

В контексте проводимой в Российской Федерации деятельности по совершенствованию нормативно-правового регулирования создания и применения биомедицинских клеточных технологий даются конкретные предложения конструктивного характера, направленные на существенное улучшение научных и практических работ в этой области. В частности, помимо ускорения принятия закона о биомедицинских клеточных технологиях и совершенствования соответствующих нормативных актов по линии Минздрава России, предлагается создать высокотехнологический центр по клеточной терапии с координационными функциями. Как вариант рассматривается формирование отдела в структуре ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Минздрава России.

Ключевые слова: биомедицинские клеточные технологии, нормативно-правовое регулирование, научно-методологические и организационные вопросы.

В настоящее время в передовых в научном отношении странах мира, а также в России успешно развивается новое медицинское направление — «регенеративная медицина», связанное со стимуляцией регенеративных процессов в различных поврежденных органах и тканях и основанное на использовании трансплантаций стволовых клеток взрослого организма (поэтому также часто используется еще один термин — «клеточная терапия») [6, 13, 14, 17, 26, 28, 29]. Ведущую роль среди используемых стволовых клеток взрослого организма играют так называемые мезенхимальные стволовые клетки (МСК), которые уже применяются или планируются к применению при лечении широкого круга социально значимых заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца, инсульт, диабет I и II типа, резистентные формы туберкулеза, аутоиммунные заболевания и ряда других болезней, а также при коррекции тяжелых поражений жизненно важных органов у онкологических больных,

возникающих после проведения радикальных курсов лучевой или комбинированной терапии, при лечении больных с тяжелыми травмами и при развитии сепсиса [1–4, 7–9, 11, 12, 18–22, 25, 27, 30].

Согласно последним имеющимся данным, в зарубежных странах сейчас ведется более 100 протокольных клинических исследований по 2- и 3-м фазам, а по ряду заболеваний такие исследования уже завершены и выданы разрешения на медицинское применение трансплантаций аутологичных и аллогенных культур МСК [19, 21, 22, 25]. Такое широкое внедрение культур МСК основано на их способности специфически накапливаться после системной (внутривенной) трансплантации в поврежденных тканях и органах, подавлять развитие деструктивных процессов и активировать репаративные процессы [1, 3, 7, 12, 13, 21, 23, 25]. МСК, кроме того, обладают уникальными иммунологическими характеристиками, не вызывают иммунного отторжения в отличие от других типов стволовых клеток и достаточно просто могут быть выращены в культуре ткани в количестве, необходимом для трансплантации [13, 23, 28]. В последнее время за рубежом МСК начали применять и для создания тканевых конструкций, которые используются для хирургического замещения поврежденных тканевых структур. Также трансплантациями МСК стали со-

© 2012 г. Конопляников А.Г., Каплан М.А., Цыб А.Ф.

* **Автор для переписки:**

Конопляников Анатолий Георгиевич

д.б.н., профессор,

руководитель отделения клеточной и экспериментальной лучевой терапии Медицинского радиологического научного центра РАМН 249036 Калужская область, Обнинск, ул. Королева, 4

Тел.: +7 (4843) 99-32-90

проводить пересадку печени и костного мозга, а в ближайшем времени можно ожидать их использование при пересадке других органов и тканей [16].

Работы в области изучения стволовых клеток и их медицинского применения велись и продолжают вестись в нашей стране с 60-х годов прошлого столетия, когда впервые появились экспериментальные методики их обнаружения у животных с помощью ионизирующей радиации и когда также были разработаны первые методики выращивания культур стволовых клеток, содержащихся в костном мозге и крови лабораторных животных и человека, в специально созданных средах. Большой вклад в развитие этих исследований внес выдающийся отечественный ученый профессор А.Я. Фриденштейн, в лаборатории которого в 1968 году впервые в мире были открыты МСК.

Исследования в области биологии и радиобиологии различных типов стволовых клеток взрослого организма, а затем и их возможного применения для диагностики и терапии были начаты в ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» (ФГБУ МРНЦ) Минздрава России более 40 лет тому назад и уже через несколько лет были разработаны методики культивирования МСК костного мозга человека, которые вначале использовались для диагностических целей. В 2006 году ФГБУ МРНЦ было выдано разрешение Федерального агентства по надзору в области здравоохранения на выращивание из пунктатов костного мозга клеточных культур МСК и получаемых из них культур кардиомиобластов для проведения клинических исследований, а в 2010 году — лицензия этого уполномоченного учреждения Минздрава России (ФС № 2010/255) на применение выращенных из МСК культур кардиомиобластов при комплексной терапии пациентов с заболеваниями, вызванными поражениями сердечной мышцы различного генеза.

Однако в последнее время лицензирование новых медицинских технологий в Минздравсоцразвития России было прекращено и практически нет законного пути для внедрения новых клеточных технологий в медицинскую практику, хотя работы в этом направлении в нашей стране продолжают. ФГБУ МРНЦ совместно с ЦНИИ гастроэнтерологии (Москва) подготовили материалы предклинических исследований и ограниченных клинических испытаний новой медицинской технологии при лечении больных с язвенным колитом и болезнью Крона, основанной на использовании системных трансплантаций культур МСК [8, 9]. Совместно с ЦНИИ туберкулеза (Москва) нами впервые в мире была показана большая эффективность дополнения специфической противотуберкулезной терапии системными трансплантациями МСК у больных

с резистентными к химиотерапии формами туберкулеза [4]. Планируются или уже ведутся клинические исследования по применению трансплантаций МСК при лечении больных с диабетом II типа, больных с эмфиземой легких и с радиационным пневмофиброзом [1, 2, 7, 9]. В экспериментах на лабораторных животных начато изучение эффективности трансплантаций МСК при поражении печени и почек, а также при травмах головного мозга и при лучевом поражении различных органов и тканей [1, 7, 11].

Аналогичные работы ведутся в ряде отечественных научных учреждений (Москва, Санкт-Петербург, Новосибирск, Томск и др.), хотя размах этих исследований и их финансирование ни в какой мере не могут быть сопоставлены с масштабом этих работ за рубежом.

В РФ так же, как и за рубежом, в последние годы начаты исследования по изучению биологических характеристик так называемых раковых стволовых клеток (РСК) [15, 24]. Первые полученные результаты дают возможность надеяться на то, что на этом пути в самые ближайшие годы будут разработаны новые лекарственные формы и вакцины, позволяющие ингибировать РСК и таким путем резко улучшить результаты лечения больных с резистентными формами злокачественных новообразований.

В России недавно впервые в мире была показана возможность применения культур МСК не только для лечебных, но и для диагностических целей, путем внутривенного введения пациентам при осуществлении радиоизотопной диагностики небольших количеств МСК, меченных радиоактивными изотопами [5]. При использовании радиоактивно меченных стволовых клеток можно будет добиться значительного повышения эффективности радиоизотопной диагностики, так как меченые МСК избирательно накапливаются в пораженных участках тела, что может обеспечить своевременную и достоверную диагностику заболеваний и, следовательно, лучшие перспективы проводимой терапии и уменьшение ее стоимости.

Вместе с тем проведение работ в области регенеративной медицины в нашей стране испытывает определенные трудности. Подготовленный более 4 лет тому назад Минздравсоцразвития России проект закона о биомедицинских технологиях, как показали неоднократные обсуждения его на Президиуме РАМН, имел ряд недостатков при сравнении с аналогичными зарубежными законами и не был принят Государственной Думой ФС РФ 5-го созыва. Теперь мы начинаем обсуждение нового варианта этого Федерального закона, который должна принять Государственная Дума ФС РФ 6-го созыва. Следует учесть

тот факт, что проблема внедрения клеточных технологий в практическое здравоохранение имеет два важных аспекта, каждый из которых должен найти свое отражение в проекте закона. Первый аспект связан с необходимостью регламентировать получение и характеристику выращенных препаратов культур тканей человека или клеток, выделенных из тканей и жидкостей человека (в последнем случае из пуповинной крови, сепаратов периферической крови и т.д.). Второй аспект данной проблемы касается стандартов лечения различных заболеваний с помощью клеточных технологий. Первое направление по своей независимости находится в зоне курирования лекарственных средств, подведомственных ФГБУ «НЦСМП», а второе направление требует нестандартного подхода и подлежит явному государственному регулированию. Последнее направление можно разделить следующим образом:

- Подготовка специалистов в области приготовления препаратов из клеток человека.
- Разработка необходимых стандартов производства препаратов из клеток человека.
- Специализация врачей различных специальностей в области применения клеточных технологий, создание специализированных факультетов в медицинских вузах, популяризация методов лечения с применением клеточных технологий.
- Проведение клинических испытаний, в том числе по совместимости клеточных технологий с лекарственной терапией.
- Разработка и утверждение стандартов лечения.
- Финансирование специализированных НИИ для разработки комплексных методов лечения заболеваний.

Такую задачу предлагается возложить на вновь создаваемое государственное учреждение с возможностью проведения исследований и клинических испытаний. Главной задачей этого учреждения (высокотехнологического центра в области клеточной терапии) будет разработка и утверждение новых стандартов лечения, а также аттестация специалистов в области клеточных технологий. Без объединения ресурсов в одном специализированном учреждении широкое внедрение указанных технологий представляется маловероятным, хотя на начальном этапе можно рекомендовать создание в ведущих научно-медицинских центрах страны специализированных отделов, которые могли бы как проводить фундаментальные исследования в области стволовых клеток и разрабатывать научное обоснование новых технологий в области регенеративной медицины, так и вести предклинические и клинические исследования в области применения новых медицинских технологий, основанных на трансплантации

стволовых клеток взрослого организма или созданных на их основе тканевых конструкций. Можно рекомендовать создание подобного отдела в ФГБУ МРНЦ Минздрава России, который в дальнейшем предполагается преобразовать в Центр ядерной медицины и в котором нашли бы достойное применение и развитие уже разработанные и совершенствующиеся новые медицинские технологии радиоизотопной диагностики и терапии с использованием трансплантации нормальных стволовых клеток и методов ингибирования роста раковых стволовых клеток.

Вторым этапом развития данного направления должна стать коммерциализация уже утвержденных стандартов в виде специализированных лицензий, выдаваемых частным и государственным организациям. Наряду с созданием государственной структуры в проекте закона целесообразно было бы отметить возможность на втором этапе развития этого важного для отечественной медицины направления создавать компании по внедрению инновационных клеточных технологий с привлечением государственных и частных (в том числе и зарубежных) инвестиций.

Можно указать также на ряд неотложных проблем, которые должен решить Минздрав России в рамках развития медицинских клеточных технологий. Так, Минздрав России пока не планирует включения уже разработанных и лицензированных в последние годы клеточных технологий в список методов высокоспециализированной медицинской помощи, которая может реализовываться на квотной основе в ведущих научно-медицинских учреждениях РФ, что тормозит внедрение в практику передовых медицинских технологий, основанных на применении системных трансплантаций стволовых клеток, а также в дальнейшем и создаваемых на их основе тканевых конструкций. Практически отсутствует работа по подготовке кадров по данной тематике, а внесенные в утвержденный Президентом РФ в 2006 году список критических технологий «клеточные технологии» до сих пор не нашли места в «Перечне работ (услуг) при осуществлении медицинской деятельности», который приложен к Постановлению Правительства РФ от 22.01.2007 года за № 30 «Об утверждении положения о лицензировании медицинской деятельности». Нет такой специальности в документах ВАК, и диссертации по данной тематике защищаются по другим специальностям.

Все изложенное выше позволяет прийти к выводу о том, что необходимо безотлагательно принять меры к поддержке проводимых работ в области клеточных технологий как одного из основных направлений, обеспечивающих разработку и быстрое внедрение в практику

новых медицинских технологий лечения пациентов с поражениями многих жизненно важных органов, что приведет к прогрессу в лечении ряда социально значимых заболеваний и тяжелых травм. Следует ускорить принятие Государственной Думой ФС РФ в ближайшие месяцы доработанного с участием специалистов в области клеточной терапии закона о биомедицинских технологиях, который до настоящего времени отсутствует. Требуется соответствующая коррекция планов Минздрава России по разработке отраслевых программ в области использования последних достижений медико-биологических наук, особенно по применению системных трансплантаций МСК и разработке методов ингибирования роста раковых стволовых клеток.

Можно надеяться, что законодательная поддержка научно-исследовательских и внедренческих работ по применению клеточных технологий в медицине как нового перспективного направления, получившего во многих странах мира значительный импульс к развитию, внесет значительный вклад в модернизацию нашего государства.

Литература

1. Аверьянов А.В., Коноплянников А.Г., Забозлаев Ф.Г. и др. Эритропоэтин улучшает эффекты мезенхимальных стволовых клеток в экспериментальной модели сепсиса. // Клиническая практика. – 2012. – Т. 2(2). – С. 4–12.
2. Аверьянов А.В., Коноплянников А.Г., Черняев А.П. и др. Экспериментальное лечение аллогенными мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками эмфиземы легких у крыс // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6(4). – С. 48–53.
3. Акчурун Р. С., Белявская Т. М., Скридлевская Е. А., Коноплянников А. Г. и др. Трансплантация аутологичных стволовых клеток во время операции коронарного шунтирования у больных ишемической болезнью сердца с постинфарктным кардиосклерозом и хронической сердечной недостаточностью // Грудная и сердечнососудистая хирургия. – 2009. – Т. 51(4). – С. 23–28.
4. Васильева И.А., Коноплянников А.Г., Ерохин В.В. и др. Лечебный эффект системной трансплантации культивируемых аутогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга у больных с резистентными формами туберкулеза легких // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. 4(1). – С. 77–80.
5. Коноплянников А.Г., Давыдов Г.А., Смолярчук М.Я. и др. Первый опыт системной трансплантации меченных технецием-99 МСК для выявления участков специфического хоминга стволовых клеток // Вестник трансплантологии и искусственных органов. Приложение «Материалы пятого Всероссийского съезда трансплантологов, 8–10 октября 2010 года, Москва». – 2010. – № 12. – С. 244–246.
6. Коноплянников А.Г., Каплан М.А., Цыб А.Ф. Реалии и перспективы клеточной терапии // Наука в России. – 2008. – Т. 28(2). – С. 14–20.
7. Курсова Л.В., Коноплянников А.Г., Пасов В.В. и др. Возможности применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток при лечении лучевых повреждений легких // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2009. – Т. 6(2). – С. 108–112.
8. Лазебник Л.Б., Князев О.В., Коноплянников А.Г. и др. Мезенхимальные стромальные клетки в комплексной противовоспалительной терапии язвенного колита // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6(4). – С. 95–103.
9. Лазебник Л.Б., Коноплянников А.Г., Князев О.В. и др. Использование аллогенных мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения при лечении воспалительных заболеваний кишечника // Терапевтический архив. – 2010. – Т. 82(2). – С. 38–43.
10. Петров В.Н., Коноплянников А.Г., Саяпина Е.В. и др. In vitro модифицирующее воздействие мезенхимальных стволовых клеток на продукцию макрофагами активных форм кислорода в аллогенной и ксеногенной системах совместных культур / В кн.: «Аутологичные стволовые клетки. Экспериментальные исследования и перспективы клинического применения. (под редакцией В.А. Ткачука)». – М.: изд Литтерра, 2009. – С. 429–448.
11. Рошаль Л.М., Цыб А.Ф., Павлова Л.Н. и др. Влияние клеточной терапии на восстановление когнитивных функций у крыс в отдаленные сроки после черепномозговой травмы // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2009. – Т. 6(3). – С. 157–165.
12. Цыб А.Ф., Коноплянников А.Г., Каплан М.А. и др. Использование системной трансплантации кардиомиобластов, полученных из мезенхимальных стволовых клеток аутологичного костного мозга, при комплексной терапии больных с хронической сердечной недостаточностью // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – Т. 4(1). – С. 78–84.
13. Цыб А.Ф., Коноплянников А.Г., Колесникова А.И., Павлов В.В. Получение и использование в медицине клеточных культур из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека // Вестник Российской Академии медицинских наук. – 2004. – Т. 59(9). – С. 71–76.
14. Bhatia R., Hare J.M. Mesenchymal stem cells: future source for reparative medicine // Congest Heart Fail. – 2005. – Vol. 11(2). – P. 87–91.
15. Bhattacharyya S., Khanduja K.L. New hope in the horizon: cancer stems cells // Acta Biochim. Biophys. Sin. – 2010. – Vol. 42(4). – P. 237–242.
16. Bianco P. Back to the future: moving beyond «mesenchymal stem cells» // J. Cell. Biochem. – 2011. – Vol. 112(7). – P. 1713–1721.

17. Caplan A.I., Dennis J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators // *J. Cellular Biochemistry*. — 2006. — Vol. 98(5). — P. 1076–1084.
18. Dai L.J., Li H.Y., Guan L.X., Ritchie G., Zhou J.X. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis // *Stem Cell Res.* — 2009. — Vol. 2(1). — P. 16–25.
19. Dill T., Schaechinger V., Rolf A. et al. Intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells improves left ventricular function in patients at risk for adverse remodeling after acute ST-segment elevation myocardial infarction: results of the Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction study (REPAIR-AMI) cardiac magnetic resonance imaging substudy // *Am. Heart J.* — 2009. — Vol. 157(3). — P. 541–547.
20. Ezquer F., Ezquer M., Contador D., Ricca M., Simon V., Conget P. The antidiabetic effect of mesenchymal stem cells is unrelated to their transdifferentiation potential but to their capability to restore Th1/Th2 balance and to modify the pancreatic microenvironment // *Stem Cells*. — 2012. — Vol. 30(8). — P. 1664–1674.
21. Giordano A., Galderisi U., Marino I.R. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells // *J. Cell. Physiol.* — 2007. — Vol. 211(1). — P. 27–35.
22. Hare J.M., Traverse J.H., Henry T.D. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2009. — Vol. 54(24). — P. 2277–2286.
23. Le Blanc K., Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation // *Biology of blood and marrow transplantation*. — 2005. — Vol. 11(5). — P. 321–334.
24. Maenhaut C., Dumont J.E., Roger P.P., van Staveren W.C. Cancer stem cells: a reality, a myth, a fuzzy concept or a misnomer? An analysis // *Carcinogenesis*. — 2010. — Vol. 31(2). — P. 149–158.
25. Mansour S., Roy D.C., Bouchard V. et al. COMPARE-AMI trial: comparison of intracoronary injection of CD133+ bone marrow stem cells to placebo in patients after acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction: study rationale and design // *J. Cardiovasc. Transl. Res.* — 2010. — Vol. 3(2). — P. 153–159.
26. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium // *Nature*. — 2001. — Vol. 410(6829). — P. 701–705.
27. Rojas M., Xu J., Woods C.R. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* — 2005. — Vol. 33(2). — P. 145–152.
28. Sotiropoulou P.A., Perez S.A., Papamichail M. Clinical grade expansion of human bone marrow mesenchymal stem cells / In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 407: *Stem Cell Assay*, chapter 17. — Humana Press, Totowa, NJ, 2007. — P. 245–263.
29. Stocum D.L. Regenerative biology and medicine // *J. Musculoskel. Neuron. Interact.* — 2002. — Vol. 2(3). — P. 270–273.
30. Urban V.S., Kiss J., Kovacs J. et al. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes // *Stem Cells*. — 2008. — Vol. 26(1). — P. 244–253.

Материалы выступления на круглом столе в Государственной Думе ФС РФ на тему «О совершенствовании законодательного обеспечения развития биомедицинских клеточных технологий в Российской Федерации» (Москва, 26 апреля 2012 г.).

EXPERIENCE MEDICAL RADIOLOGICAL RESEARCH CENTER OF RUSSIAN MINISTRY OF HEALTH IN THE FIELD OF BIOMEDICAL CELL TECHNOLOGIES AND PROPOSALS FOR THE REGULATORY OVERSIGHT OF SUCH WORK ON THEIR STATE AID

A.G. KONOPLYANNIKOV, M.A. KAPLAN, A.F. TSYB

Medical Radiological Research Center, Ministry of Health of Russia, Obninsk

In the context of the in RF efforts to improve regulatory development and application of biomedical cell technologies provide specific constructive proposals to significantly improve the scientific and practical work in this field. In particular, in addition to accelerating the adoption of the law on biomedical cell technologies and improvement of relevant regulations under Russian Ministry of Health, it is proposed to create a high-tech center for cell therapy coordinating functions. Considered as a variant of the formation of the department in the structure of Medical Radiological Research Center, Russian Health Ministry.

Keywords: biomedical cell technologies, legal regulation, scientific, methodological and organizational issues.

НЕОБХОДИМОСТЬ СООТВЕТСТВИЯ НОРМАТИВНО-ПРАВОВОГО РЕГУЛИРОВАНИЯ РЕАЛЬНОМУ ПРОЦЕССУ СОЗДАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ БИМЕДИЦИНСКИХ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Г.П. ПИНАЕВ*

ФГБУН «Институт цитологии» РАН, Санкт-Петербург

На основании собственного многолетнего опыта в области применения клеточных технологий в медицине автор предлагает ряд мер в основном нормативно-правового и организационного характера с целью развития данного направления в РФ. При этом обращается внимание на перспективность организации специального образовательного объединения на базе научных учреждений, имеющих длительный опыт работы с клеточными культурами и создания клеточных технологий.

Ключевые слова: биомедицинские клеточные технологии, нормативно-правовое регулирование, образовательные программы.

В настоящее время создание биомедицинских клеточных технологий для лечения тяжелых заболеваний человека является чрезвычайно актуальным и востребованным направлением исследований в области клеточной биологии и медицины во всем мире. Тем не менее развитие клеточных технологий и их реализация в нашей стране сдерживаются в силу недостаточной финансовой поддержки и отсутствия четких правовых норм и законодательства, регулирующего все этапы создания, оценки эффективности и биобезопасности, регистрации новых клеточных технологий, а также производства клеточных продуктов и их применения в лечебных учреждениях.

В Отделе клеточных культур Института цитологии РАН с конца 80-х годов прошлого века непрерывно ведутся разработки новых клеточных технологий, предназначенных для восстановления поврежденных органов и тканей человека. В начале этих исследований в России еще никто фактически не занимался решением подобных проблем. Поэтому в этой чрезвычайно сложной деятельности были последовательно пройдены все необходимые этапы создания первых клеточных продуктов. На основании полученных результатов выполненной работы по решению Комитета по новой медицинской технике

Министерства здравоохранения РФ были проведены технические, токсикологические и клинические испытания, созданы технические условия на данные изделия медицинского назначения и после регистрации в Росздравнадзоре было получено разрешение на их серийное производство и клиническое использование.

Первыми созданными изделиями медицинского назначения, в которых использовались клетки кожи человека, были следующие клеточные продукты: «Пласт кератиноцитов многослойный, ПКМ» и «Эквивалент дермальный, ЭД», предназначенные для лечения термических поражений, трофических язв и ран другой этиологии. С помощью этих разработанных технологий в процессе клинических исследований и клинических испытаний к настоящему времени вылечено 450 пациентов с разнообразными повреждениями кожного покрова и другими ранами. К наиболее впечатляющим результатам лечения следует отнести восстановление кожного покрова после 90 и 98% критических ожогов поверхности тела у двух пациентов.

Многолетний успешный опыт собственной работы и анализ международных достижений в этой области свидетельствуют о том, что высокая эффективность созданных клеточных продуктов может быть достигнута только при условии соблюдения разработчиками четкой последовательности действий и привлечения к разработке специалистов высокого профессионального уровня из разных областей биологии, химии, физики и медицины, соответствующих каждому направлению решаемой задачи.

Практика разработок клеточных технологий показывает, что для успешного достижения цели необходимо осуществить следующие этапы.

© 2012 г. Пинаев Г.П.

* **Автор для переписки:**

Пинаев Георгий Петрович

д.б.н., профессор

Институт цитологии РАН,

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, 4

Тел.: +7 (812) 297-42-96

E-mail: pinaev@mail.cytspb.rssi.ru

1. *Проведение фундаментальных исследований, ориентированных на создание конкретной клеточной технологии.* Данные исследования должны выполняться клеточными биологами, которые разрабатывают методы выделения и культивирования требуемых клеток, определяют состав питательных сред и выявляют необходимые ростовые факторы и другие молекулы, способствующие размножению клеток и выполнению ими восстановительных функций при имплантации в зону повреждения. При этом следует обратить внимание на то, что необходимость проведения фундаментальных исследований возникает на всех этапах разработки технологий, так как очень часто на этом пути возникают проблемы, связанные с неадекватным поведением клеток при изменении микроокружения и в результате введения в создаваемый клеточный продукт новых сопутствующих веществ и материалов. Поэтому к этим исследованиям приходится возвращаться в течение всего процесса разработки вплоть до создания окончательного варианта данной технологии.

2. *Создание клеточного продукта.* В связи с тем, что введение в зону повреждения одних только культивируемых стволовых или других клеток во многих случаях не дает желаемого результата из-за негативного действия микроокружения раны, в последнее время разработчики идут по пути создания клеточных продуктов, представляющих собой культивируемые клетки, включенные в сложные трехмерные композиции, которые могут состоять из компонентов внеклеточного матрикса, биосовместимых полимеров и других веществ. В создании подобных клеточных продуктов, как правило, помимо клеточных биологов, принимают также участие химики и физики.

3. Для выявления эффективности и биобезопасности разработанных клеточных продуктов следующим этапом создания клеточной технологии является *проведение доклинических исследований на лабораторных животных.* Для этой цели экспериментальным животным наносят повреждение соответствующей ткани или органа, максимально приближенное по своему характеру к той патологии, которую предполагают лечить у человека. При этом проверяется отсутствие воспалительных и других негативных реакций организма на введение в рану клеточного продукта, а также выясняют их влияние на степень и скорость восстановления структуры и функции поврежденной ткани.

4. После успешного завершения доклинических исследований создаются *технические условия, содержащие данные о составе, свойствах клеточного продукта, процессе его изготовления, хранения и транспортировки.* Затем в специализированных учреждениях

проводятся технические и токсикологические испытания для проверки его безопасности и осуществления контроля качества. Только после убедительного положительного результата испытаний и доклинических исследований разработанные клеточные продукты могут быть использованы в клинических исследованиях на человеке. Для этой цели создают план клинических исследований и получают разрешение на их проведение.

5. *Проведение клинических исследований возможности применения клеточного продукта при лечении человека* осуществляется специалистами медицинских учреждений, имеющих опыт практической работы в данной области. Испытания проводятся при участии разработчиков для оптимизации способа введения клеточного продукта в зону повреждения, а также в связи с возможной необходимостью внесения в состав клеточного продукта некоторых модификаций для большей его эффективности при лечении поврежденных тканей человека. В ходе проведенных исследований происходит завершение создания конкретной клеточной технологии. Затем оформляют протокол применения клеточных продуктов в клинике и получают разрешение на проведение клинических испытаний.

Клинические испытания проводятся в лечебных медицинских учреждениях согласно разработанному протоколу и в случае их успешных результатов на их основе создаются регламенты приготовления клеточного продукта, контроля его качества и применения в медицинской практике.

После завершения всех перечисленных исследований и испытаний в Росздравнадзор представляются паспорта клеточной технологии, технические условия, регламенты, результаты проведенных испытаний для регистрации разработанной клеточной технологии и получения разрешения на производство и клиническое использование клеточных продуктов.

Перечисленные этапы разработки клеточных технологий и оценки их эффективности сформировались на протяжении многих лет и неоднократно демонстрировали необходимость четкого соблюдения последовательных действий для успешного достижения поставленной цели. В связи с этим в рамках планируемого федерального закона о биомедицинских клеточных технологиях имеет принципиально важное значение наличие соответствия нормативно-правового регулирования реальному процессу их создания.

Знакомство с последним вариантом текста закона свидетельствует о том, что он требует внесения ряда существенных уточнений и поправок как в используемую терминологию, так и в последовательность и характер регулирующих нормативных действий со стороны

Министерства здравоохранения РФ, от лица которого предлагается данный закон. Прежде всего, следует обратить внимание на то, что биомедицинская клеточная технология — это не получение клеточного продукта, как указано в проекте, а метод или способ восстановления структуры и функции поврежденных органов и тканей с помощью вводимых извне клеток или клеточных продуктов, полученных из клеток и сопутствующих материалов.

Начальные этапы разработки технологий представляют собой проведение исследований, то есть поиск путей и способов достижения поставленной цели. Поэтому исследования проводятся согласно заявляемому проекту и плану действий. Протокола исследований не должно быть раньше самих исследований. Протокол означает точное расписание всех действий и методов, поэтому он может быть составлен только на основе результатов уже проведенных исследований и является предписанием, как нужно выполнять данную, уже разработанную технологию, чтобы получить желаемый результат. В связи с этим никакой экспертизы протокола еще невыполненного исследования не должно быть. Не должно быть также контроля биомедицинского исследования. Может быть проведена только оценка выполнимости поставленных задач, их актуальности и допустимости медицинского использования планируемой технологии. Контролировать надо конечный результат согласно разработанному регламенту, то есть готовую клеточную технологию или изделие. Кроме того, должен быть контроль производства и качества выпускаемого продукта.

Завершение создания биомедицинских клеточных технологий, начиная с доклинических исследований, безусловно, должно сопровождаться экспертизой, на основании результатов которой дается разрешение на проведение следующего этапа. Экспертизе должны подвергаться результаты проведенной работы и созданные документы, но не проведение экспертом самостоятельных исследований, как указано в законе. Проводить самостоятельное исследование означает осуществить огромную экспериментальную работу, которую уже сделал разработчик и с еще неизвестным результатом. Делать это бессмысленно. Оценивать нужно результат воздействия технологии по данным клинических испытаний. Кроме этого, эксперту в данном случае нужно создать такую же экспериментальную базу, как у разработчика. Подобный подход разрушит развитие клеточных технологий в стране в принципе. Помимо этого, потребуются проверять самого эксперта и правильность его действий. Короче говоря, эксперт не должен проводить исследования — он должен оценивать результаты исследований и испытаний,

проведенных разработчиком и специализированным медицинским учреждением.

Проводить регистрацию клеточной технологии по результатам доклинического исследования бессмысленно. Это чисто бюрократический прием, отнимающий время и тормозящий процесс создания клеточной технологии. Регистрацию нужно проводить только после завершения клинических исследований и испытаний. По результатам доклинического исследования федеральным органом должно даваться разрешение на клинические испытания и после их успешного завершения может осуществляться государственная регистрация. По результатам доклинического исследования должны быть составлены технические условия, а не паспорт. Паспорт может быть составлен только после успешного завершения клинических испытаний. Также еще не может быть проекта инструкции по применению клеточного продукта. Инструкция может быть создана только после проведения клинических исследований.

В законе присутствует раздел, посвященный клиническим исследованиям, но в нем полностью отсутствует понятие клинических испытаний. В то же время оценку клинической эффективности разработанной клеточной технологии и клеточных продуктов обязательно нужно проводить в два этапа.

Проведение клинических исследований необходимо в связи с тем, что разработанная и проверенная на лабораторных животных в процессе доклинических исследований технология может требовать уточнений, усовершенствований и изменений при применении ее для лечения человека. Кроме того, на основе полученных результатов создается протокол, инструкция или регламент применения данных клеточных продуктов в клинике. После доведения технологии до оптимальной эффективности она должна пройти следующий этап, то есть клинические испытания в клиниках, не принимавших участия в клинических исследованиях.

Клинические испытания должны проводиться назначенными медицинскими учреждениями согласно инструкции, составленной разработчиком на основании доклинических и клинических исследований. Эти испытания должны показать, насколько успешно разработанный способ применения клеточных продуктов может быть использован в практической медицине. Положительные результаты испытания являются основанием для государственной регистрации конкретной клеточной технологии или клеточного продукта.

Основные этапы разработки клеточных технологий осуществляются главным образом государственными научными учреждениями и поэтому не могут финансироваться

за счет средств разработчика, так же, как и клинические испытания. Для этого необходимы средства федерального бюджета. Кроме того, в законе полностью отсутствует раздел о способах финансирования приобретения и применения клеточных продуктов лечебными учреждениями. Без специального финансового обеспечения самые совершенные и эффективные клеточные технологии не найдут широкого применения в практической медицине.

В проекте закона отсутствует чрезвычайно важное положение о том, на каких условиях, где и какие медицинские учреждения получают лицензию на проведение работ по применению клеточных технологий. На сегодняшний день эти правила отсутствуют и уже разработанные технологии легально использоваться в клинике не могут. Эти лицензии следует выдавать безотлагательно еще до окончательного вступления в силу данного закона, так как без них невозможно проводить необходимые исследования и испытания, а также применять уже существующие готовые, испытанные и зарегистрированные клеточные продукты и технологии, что значительно сдерживает развитие клеточных технологий в стране.

Опыт нашего взаимодействия с представителями клиник Санкт-Петербурга и Москвы в процессе проведения клинических исследований и испытаний показывает, что для успешного применения клеточных продуктов совершенно необходимо обучать медицинский персонал правильной работе с клеточным материалом. В проекте закона есть раздел, посвященный этой проблеме. Из текста, однако, остается неясным, где и каким образом предполагается проводить дополнительное образование медицинских работников по вопросам применения клеточных продуктов.

Следует подчеркнуть, что в РФ нет ни одного высшего учебного учреждения, обучающего грамотной практической работе с клеточными культурами, без которых не может быть ни создания, ни применения клеточных

технологий. Именно поэтому решением Правительства СССР в Институте цитологии РАН в 1974 г. был создан Отдел клеточных культур, который в настоящее время совместно с «Межрегиональной научно-общественной организацией специалистов по клеточным культурам» проводит интенсивную деятельность по обучению методам культивирования клеток и по принципам создания клеточных технологий — путем проведения большого числа стажировок сотрудников научных и медицинских учреждений из разных городов России и стран СНГ.

Создать сразу некий новый образовательный центр для этих целей нереально, потому что это займет много лет, прежде чем он начнет профессионально работать. Наиболее перспективной представляется организация специального образовательного объединения на базе научных учреждений, имеющих длительный опыт работы с клеточными культурами и разработкой клеточных технологий. Кроме того, в каждом отдельном случае, помимо общего дополнительного образования, необходимо подробное ознакомление с инструкцией по применению разработанного создателем клеточного продукта совместно с медицинскими сотрудниками, проводившими клинические исследования.

Данный краткий анализ состояния дел с нормативно-правовым регулированием процесса создания и применения клеточных технологий приводит к заключению о необходимости привлечения специалистов, создающих клеточные технологии, к процессу формирования окончательного варианта текста указанного крайне необходимого закона.

Материалы выступления на круглом столе в Государственной Думе ФС РФ на тему «О совершенствовании законодательного обеспечения развития биомедицинских клеточных технологий в Российской Федерации» (Москва, 26 апреля 2012 г.).

COMPLIANCE WITH REGULATORY ACTUAL PROCESS OF CREATION AND APPLICATION OF BIOMEDICAL CELL TECHNOLOGIES

G.P. PINAEV

Institute of Cytology of RAS, St. Petersburg

Based on their extensive experience in the use of cellular technology in medicine author proposed a number of measures in the main legal and organizational nature for the development of this field in Russia. At the same time drawing attention to the prospect of setting up special educational association on the basis of scientific institutions with long experience of working with cell cultures and the development of cell-based technologies.

Keywords: biomedical cell technologies, legal regulation, educational programs.

К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ВЫДАЮЩЕГОСЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО БИОЛОГА САЛЬВАДОРА ЛУРИА

В.С. ВОРОБЬЕВ*

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



В 2012 году исполняется 100 лет со дня рождения Сальвадора Лурия, лауреата Нобелевской премии, члена знаменитой «фаговой группы-тройки», стоявшей у истоков создания молекулярной биологии — М. Дельбрюка, А. Херши и С. Лурия. За это время накопилось много биографических работ о нем, исследований и оценок исторического значения его научного вклада. Важное место в его историографии занимает автобиография, написанная объективно и помогающая воссоздавать этапы и детали формирования его как личности и ученого [7].

© 2012 г. Воробьев В.С.

* **Автор для переписки:**

Воробьев Вадим Сергеевич

к.м.н., член Центрального Правления

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

E-mail: obr@biorosinfo.ru

Краткая биография. Сальвадор Эдвард Лурия родился 13 августа 1912 года в Турине (Италия). Отец — Давид Лурия принадлежал к известной семье сефардов, по профессии — бухгалтер; мать — Эстер Сачердоте. Российская ветвь этого древнего рода, берущего начало из Испании (с перемещением в Казань, а затем в Москву), реализовалась в отце и сыне Лурия — терапевте и психологе. Будущий ученый получил среднее образование в местном лицее Massimo d'Azeglio (здесь ему преподавали философию и литературу философ-марксист Антонио Грамши и Аугусто Монти, писатель и известный политический деятель), после чего в 1929 г. поступил на медицинский факультет Туринского университета. В университете Лурия занимался гистологией у профессора Джузеппе Леви, однако эта наука не увлекла его. Здесь же на кафедре Дж. Леви он познакомился с Ренато Дульбекко и Ритой Леви-Монтальчини, будущими Нобелевскими лауреатами и братьями по эмиграции в США. По окончании с отличием университета (1935) Лурия в 1936—1937 гг. служил в армии санитарным инспектором. В 1938 г. по совету своего друга Уго Фано в течение года занимался физикой, точнее радиологией, в Физическом институте Римского университета. Он не чувствовал в себе призвания к точным наукам, однако общение с физиками (в том числе и с Энрико Ферми) ему пригодилось впоследствии, когда он многие годы трудился бок о бок с физиком Максом Дельбрюком.

Принадлежность к еврейской семье в период ужесточения фашистского режима Муссолини (провозглашение «Расового манифеста» 18 июля 1938 г.) и укрепления альянса с нацистской Германией заставила его эмигрировать во Францию. В 1938—1940 гг. С. Лурия был сотрудником лаборатории Фернанда Хольвека в Радиевом институте в Париже, после чего уехал в Америку (также под давлением обстоятельств — начала Второй мировой войны и оккупации Франции). Отъезд за океан был наполнен драматическими событиями: после вступления немцев на север Франции в июне 1940 г. он на велосипеде доехал до Марселя, там получил американ-

скую иммиграционную визу, добрался через Испанию до Лиссабона, а дальше после трансатлантического плавания прибыл 12 сентября в Нью-Йорк. По протекции Энрико Ферми он получил рокфеллеровскую стипендию и поступил на работу в Колумбийский университет на должность хирургического бактериолога (1940–1942). Именно к этому периоду (декабрь 1940 г.) относится его личное знакомство с М. Дельбрюком, которое закрепилось в многолетнее сотрудничество и дружеские отношения.

С 1943 по 1950 г. Лурия был преподавателем, доцентом и профессором бактериологии в Университете штата Индиана (Блумингтон). Здесь у него был первым аспирантом Джеймс Уотсон, будущий первооткрыватель двойной спирали ДНК, лауреат Нобелевской премии. В 1945 г. он женился на Зелле Хервиц, психологе по специальности. У них родился сын Дэниел. В 1947 году Лурия принял гражданство США. В первые месяцы пребывания в США он изменил свое родное итальянское имя «Salvatore» (которое недолюбливал) на «Salvador E.» + Luria. В ответ на вопрос, что означает «E», говорил официально, что это — «Edward».

В 1950 году Лурия перешел на работу в Университет штата Иллинойс (Урбана) на должность профессора микробиологии и трудился здесь до 1959 г., после чего с 1959 по 1964 гг. был профессором Массачусетского технологического института (МТИ), в котором заведовал кафедрой микробиологии и с которым связалась его дальнейшая деятельность. В 1964–1970 гг. Лурия — седжвиковский профессор биологии МТИ. С 1965 года он состоял также профессором-консультантом Солковского института в Сан-Диего (Калифорния). В 1970 г. он получил звание профессора в отделе биологии МТИ и оставался в этой должности до 1991 года. С 1972 до 1985 гг. Лурия занимал пост директора Центра раковых исследований при МТИ, где под его руководством работали будущие Нобелевские лауреаты — Дэвид Балтимор (1975), Сузуму Тонегава (1987), Филлип Шарп (1993), Роберт Горвиц (2002).

Лурия умер 6 февраля 1991 года в Лексингтоне (штат Массачусетс). Дж. Уотсон откликнулся некрологом памяти своего учителя [31].

Научная деятельность. Говоря об особенностях научной работы С. Лурия, необходимо подчеркнуть, прежде всего, три обстоятельства. Во-первых, контакт с М. Дельбрюком. Во-вторых, оригинальность избранного объекта исследования (бактериофага). В-третьих, безусловно, талант исследователя, способного к экспертно-аналитической работе и неожиданным, иногда парадоксальным ассоциациям (как, например, аналогия с игровым автоматом при изучении мутаций).

Лурия нельзя рассматривать в отрыве от Дельбрюка, по крайней мере, его старт в большую науку. Два эмигранта из стран-противников, воюющих с США, — у них много общего, несмотря на происхождение: Дельбрюк принадлежал к германской интеллектуальной элите, Лурия — к среднему итальянскому классу. Как уже указывалось, Лурия встретился с Дельбрюком в конце 1940 г. в Филадельфии на заседании физиологического общества. Тот перевез с собой через океан идею молекулярного переноса генетической информации, генерированную впервые в мозгу Н.К. Кольцова, трансформированную и переданную как эстафету через его ученика Н.В. Тимофеева-Ресовского Дельбрюку во время берлинских дискуссий и утвердившуюся во время их совместной работы 1930-х годов. Правда, Лурия в своей автобиографии говорит, что еще в 1938 году он пытался направить гипотезы Дельбрюка о генах на бактериофага. Самое же главное — оба начинающих исследователя загорелись идеей молекулярной структуры гена и научились думать и трудиться вместе. Сохранились в архивах и на сайтах их фотографии тех лет, где они, молодые и всегда веселые, как правило, заняты делом или в минутном отдыхе-расслаблении.

Многие биографы итало-американского ученого часто конспективно излагают ранний период его жизни и творчества, делая в основном акцент на его вынужденное бегство из Европы в США от нацистских преследований. Между тем он не только перемещался из лаборатории в лабораторию в поисках безопасного пристанища, но и активно и целеустремленно работал. Так, еще в Риме он по совету Франко Розетти (посещавшего Берлин в начале 1930-х годов и бывшего в курсе трудов немецких ученых) познакомился с работами Германа Меллера и Н.В. Тимофеева-Ресовского по радиационному мутагенезу у дрожофилы и широко известной статьей «трех мужчин» — Н.В. Тимофеева-Ресовского, К. Циммера и М. Дельбрюка о новой концепции гена (1935) [29]. По рекомендации другого наставника Гео Рита (в будущем — профессор вирусологии Римского университета) Лурия начал ставить радиобиологические эксперименты с бактериофагом, которые были продолжены им в Париже, в Радиевом институте. В результате появилась публикация С. Лурия с соавторами в «Nature», посвященная изучению влияния радиации на бактериофаг C16 [32].

Так что Лурия прибыл в США уже достаточно подготовленным исследователем со сформированным устойчивым интересом к разработке проблем бактериофагов. Кстати, в США в 1941 году вышла в свет статья Лурия и Экснера, продолжившая тему «бактериофаг и радиация» [10]. Поэтому альянс Лурия и Дельбрюка

MUTATIONS OF BACTERIA FROM VIRUS SENSITIVITY TO VIRUS RESISTANCE^{1,2}

S. E. LURIA³ AND M. DELBRÜCK
*Indiana University, Bloomington, Indiana, and
Vanderbilt University, Nashville, Tennessee*

Received May 29, 1943

INTRODUCTION

WHEN a pure bacterial culture is attacked by a bacterial virus, the culture will clear after a few hours due to destruction of the sensitive cells by the virus. However, after further incubation for a few hours, or sometimes days, the culture will often become turbid again, due to the growth of a bacterial variant which is resistant to the action of the virus. This variant can be isolated and freed from the virus and will in many cases retain its resistance to the action of the virus even if subcultured through many generations in the absence of the virus. While the sensitive strain adsorbed the virus readily, the resistant variant will generally not show any affinity to it.

The resistant bacterial variants appear readily in cultures grown from a single cell. They were, therefore, certainly not present when the culture was started. Their resistance is generally rather specific. It does not extend to viruses that are found to differ by other criteria from the strain in whose presence the resistant culture developed. The variant may differ from the original strain in morphological or metabolic characteristics, or in serological type or in colony type. Most often, however, no such correlated changes are apparent, and the variant may be distinguished from the original strain only by its resistance to the inciting strain of virus.

The nature of these variants and the manner in which they originate have been discussed by many authors, and numerous attempts have been made to correlate the phenomenon with other instances of bacterial variation.

The net effect of the addition of virus consists of the appearance of a variant strain, characterized by a new stable character—namely, resistance to the inciting virus. The situation has often been expressed by saying that bacterial viruses are powerful “dissociating agents.” While this expression summarizes adequately the net effect, it must not be taken to imply anything about the mechanism by which the result is brought about. A moment’s reflection will show that there are greatly differing mechanisms which might produce the same end result.

D’HERELLE (1926) and many other investigators believed that the virus by direct action induced the resistant variants. GRATIA (1921), BURNET (1929), and others, on the other hand, believed that the resistant bacterial variants are produced by mutation in the culture prior to the addition of virus. The

¹ Theory by M. D., experiments by S. E. L.

² Aided by grants from the DAZIAN FOUNDATION FOR MEDICAL RESEARCH and from the ROCKEFELLER FOUNDATION.

³ Fellow of the GUGGENHEIM FOUNDATION.

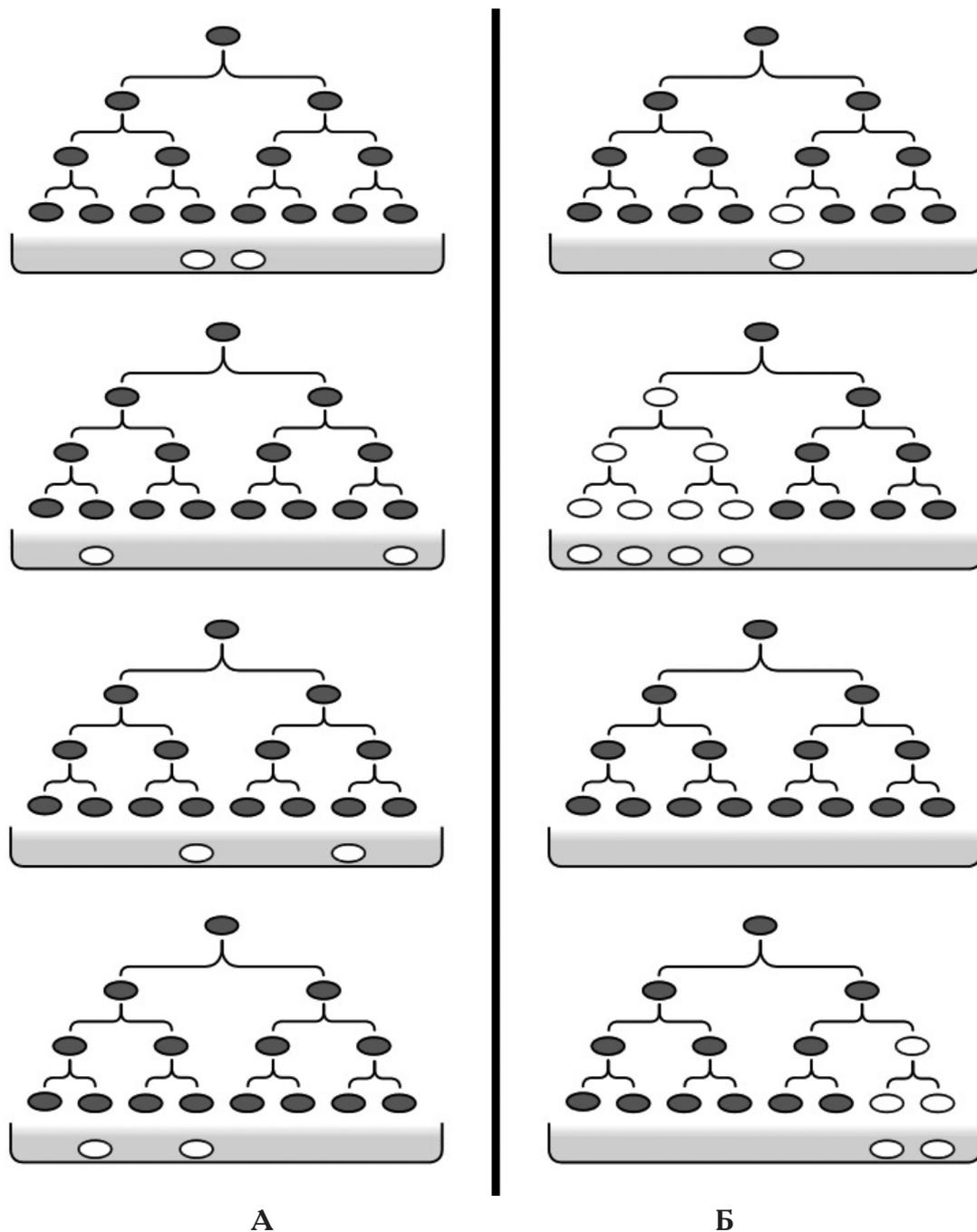


Рис. 2. Схема эксперимента Луриа – Дельбрюка. Две возможности, проверенные в этом опыте: А – если мутации вызваны средой, то примерно одинаковое число мутантов ожидается в каждой чашке Петри (индуцированные мутации); Б – если мутации возникают спонтанно, во время клеточного деления до посева, то в каждой чашке будет варьировать число мутантов (спонтанные мутации). Светлыми кружочками обозначены мутанты

явился не простой случайностью, а был продиктован встречным движением друг к другу и обоюдным заделом по вопросу, представляющему интерес для обоих.

После встречи Луриа и Дельбрюка на американской земле ими была намечена программа совместной работы по фаговой тематике. Позднее в 1943 году к ним присоединился Алфред Херши из Университета Вашингтона, и так образовалась «фаговая группа», внесшая существенный вклад в формирование моле-

кулярной биологии. Эффективность их совместных исследований определялась принятием единой методологии как в отношении объекта (штаммов бактериофагов – типы Т1–Т7, инфицирующие линии *E. coli*), так и стандартизации методов. Это позволило несмотря на нахождение в разных городах: Дельбрюк (Нашвилль) – Херши (Сент-Луис) – Луриа (Нью-Йорк, Блумингтон) получать сравнимые результаты и оперативно обмениваться информацией. При этом

они проводили как совместные, так и самостоятельные исследования порознь, то есть функциональный «треугольник» замыкался как попарными, так и индивидуальными результатами. Кроме того, Лурия и Дельбрюк трудились вместе летом в Cold Spring Harbor Laboratory, а также в Нашвилле — постоянном месте работы Дельбрюка.

Первым значимым событием в их коллективной деятельности стала работа Лурия и Дельбрюка (1943) о так называемом «флуктуационном тесте» — эксперимент Лурия — Дельбрюка [8]. Сейчас при ретроспективном рассмотрении она представляется как классика молекулярной биологии, но уже и тогда в разгар II Мировой войны она была оценена как основа зарождающейся бактериальной генетики (рис. 1).

Суть работы заключалась в сравнении числа мутаций у микроорганизмов, возникающих спонтанно, с числом мутаций, индуцированных средой. Схема эксперимента представлена на рисунке 2.

Авторы вводили небольшое количество бактерий *E. coli*, чувствительных к фагу, в отдельные пробирки для культивирования. После периода роста они высевали равные объемы этих культур на чашки с агаром, содержащим бактериофаг. Еще до постановки опыта из теории было известно, что в таких случаях большинство бактерий гибнет, но остается незначительная часть живых клеток. При этом возможны два объяснения: первое — это то, что фаг вызывает у бактерий устойчивость к своему действию; второе — альтернативное мнение о том, что бактериальная устойчивость к фагу обусловлена спонтанной генной мутацией, происходящей до контакта с фагом. Экспериментаторы (Дельбрюк и Лурия) рассуждали следующим образом. Если фагоустойчивость у бактерий вызывается спонтанной активацией, то есть если устойчивость не обусловлена наследственными генетическими компонентами, то каждая чашка должна содержать приблизительно одинаковое число устойчивых колоний. Оказалось, что это не так: число устойчивых колоний *E. coli* на каждой чашке сильно варьирует. В процессе работы при обдумывании полученных результатов Лурия обратил внимание на вероятность выигрыша в игровых автоматах («slot machine» — потом он дал такое название своей автобиографии) и увидел в этом какое-то сходство с экспериментальными данными. Расчеты, сделанные таким квалифицированным физиком, как Дельбрюк, точно уложились в случайное (пуассоново) распределение. Это утвердило авторов в том, что мутации у бактерий, как и у других организмов, скорее случайны, чем направлены. Они пишут, заклю-

чая статью: «Мы рассматриваем вышеприведенные результаты как доказательство того, что в нашем случае устойчивость к вирусу обусловлена наследственным изменением бактериальной клетки, которое происходит независимо от действия вируса. Остается решить, является ли это или нет общим правилом. Есть резон полагать, что механизм более сложен в случаях, когда устойчивая культура развивается только несколько дней после лизиса сенситивных бактерий» [8, р. 509]. Иными словами, на фундаментальный вопрос биологии можно ответить, что мутанты возникают до отбора, а не вследствие отбора. Позднее (1944 г.) Лурия обнаружил спонтанные мутации и у бактериофагов.

Примерно в это же время (1942–1943) С. Лурия вместе с Т. Андерсоном и М. Дельбрюком осуществили электронно-микроскопическое исследование бактериофагов [19, 20]. Пионер изучения бактериофагов в США Дж. Бронфенбреннер был поражен, увидев на снимках у вируса хвост!

Далее фаговая группа работала больше по индивидуальным программам. Линия исследований Лурия выглядит следующим образом. В 1945–1946 гг. он изучил вариабельность типов мутаций у бактерий и бактериофагов [17]. Позже им были исследованы механизмы репродукции фагов, основанные на распределении размеров клонов спонтанных мутантов [15, 18].

Важно указать на то, что в своих тщательных исследованиях фагов начала 1950-х годов Лурия натолкнулся на феномен рестрикции и модификации ДНК [11, 13] задолго до обнаружения рестриктаз (1971), открывших путь для рекомбинантных технологий.

В эпоху после открытия двойной спирали ДНК в 1953 г. главное внимание Лурия сосредоточил на продолжении фагового цикла и подготовке студентов и аспирантов. В конце 1950-х — начале 1960-х гг. его научные интересы переместились от фагов к исследованию клеточных мембран и бактериоцинов (это совпало по времени с переходом в Массачусетский технологический институт). В 1963 году в период профессорского отпуска (1 раз в 7 лет — освобождение от чтения лекций) Лурия работал в Париже, в Институте Пастера, в лаборатории Моно, где изучал феномен нарушения бактериоцином функций клеточных мембран.

В 1969 году произошло знаменательное событие в научной жизни Лурия — получение Нобелевской премии по физиологии и медицине «за открытия, касающиеся механизма репликации и генетической структуры вирусов» — совместно с Максом Дельбрюком и Алфредом Херши (рис. 3).

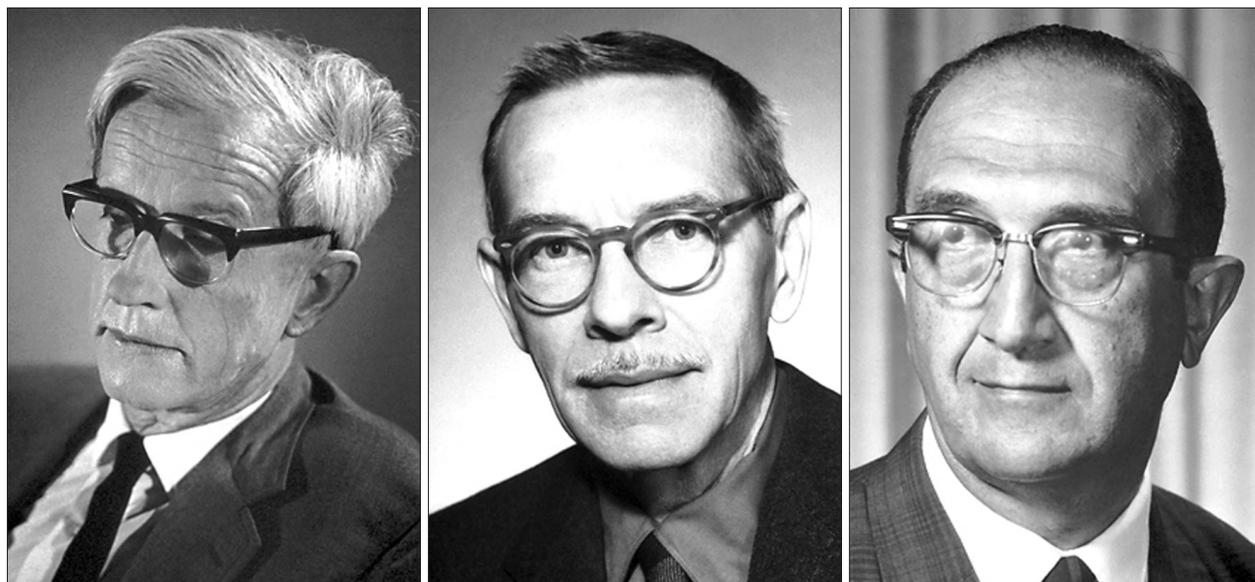


Рис. 3. «Фаговая группа» — лауреаты Нобелевской премии (1969).
Слева направо: М. Дельбрюк, А. Херши, С. Лурия

Премия была вручена с задержкой, спустя четверть века после базовых приоритетных работ лауреатов. Такому решению Нобелевского комитета во многом способствовала юбилейная книга 1966 года «Фаги и зарождение молекулярной биологии» [24], вышедшая к 60-летию Макса Дельбрюка и давшая историческую оценку весомого вклада фаговой группы в становление молекулярной биологии. Одним из соредкторов этого сборника статей известных специалистов был Нобелевский лауреат 1962 года Дж. Уотсон, ученик двух членов фаговой группы — Лурия и Дельбрюка. В этой книге были опубликованы и статьи Уотсона [30], и Лурия [14]. Лурия в соответствии с протоколом выступил на Нобелевских торжествах с лекцией под названием «Фаги, колицины и макромолекулярные явления» [16].

Как это часто бывает при запоздалых вручениях премий, виновники событий редко обращаются в Нобелевской речи к реальной теме, за которую дана награда, а говорят о своих текущих исследованиях. Так и Лурия фактически ничего не сообщил о работах «фаговой тройки» 1940-х годов, а в основном обсудил темы колицинов и мембранологии (об этом свидетельствует и список цитированной литературы, в котором упоминаются работы главным образом 1960-х и конца 1950-х годов). Примерно также выступили в Стокгольме и Дельбрюк с Херши. Нобелевский триумф, конечно, благоприятствовал признанию заслуг и укреплению авторитета Лурия, в том числе утверждению на пост директора Института раковых исследований при МТИ, где в высшей степени проявились его научно-организационные способности.

В юбилейных статьях принято говорить о позитивных моментах, не указывая на какие-либо противоречия или ошибки. В этой связи уместно упомянуть, как академик П.К. Анохин, будучи молодым 30-летним профессором Горьковского (ныне — Нижегородского) мединститута, подготовил юбилейную биографическую статью о своем великом учителе И.П. Павлове и отослал ее на просмотр тому в Ленинград. Иван Петрович ответил ученику, что все правильно, но побольше сомнения, в том числе и раздумий о возможной ошибке (в послужном списке И.П. Павлова были две крупные ошибки — непризнание наличия гуморальной стадии секреции пищеварительных соков и поддержка идеи наследования условных рефлексов).

В случае с Лурия есть один момент, который всегда огорчал его при собственных воспоминаниях. Это — ошибочное признание белка генетическим материалом у бактериофагов, причем после выхода революционной статьи Эйвери 1944 г. о наследственной роли ДНК и в канун выдающегося эксперимента Херши 1952 г., поставившего точку в этом вопросе. В автобиографии Лурия называл данный эпизод «научной оплошностью, которая иногда еще вызывает у меня чувство стыда, как память о дурном или неправильном поведении» [25].

Общественная деятельность. В бытность свою в Италии Лурия был политически инертным, а в США, как бы компенсируя это, стал активно участвовать в общественной жизни, проявляя симпатии к левым. Он в 1957 г. примкнул к движению, возглавляемому Лайнусом Полингом, против испытаний ядерного оружия.

Выступал он против войны в Корее и Вьетнаме, а также агрессии Израиля против Ливана. Организовывал демонстрации, протестовал против строительства атомных электростанций.

Известно, что часть Нобелевской премии он передал антивоенным группам. Он даже называл себя социалистом, хотя скорее всего был пацифистом. В 1970-е годы участвовал в дискуссии о геномной инженерии, занимая в целом компромиссную позицию. В авторитарном государстве такая социальная позиция была бы просто убийственной. Но и в демократической стране управленческие структуры, по-видимому, не бывают в восторге от избыточной гражданской активности, идущей вразрез с генеральной политической линией. Так что повышенная общественная деятельность ученого была замечена властями (включая ФБР), и его имя было занесено в «черный список»: как следствие это отразилось на финансировании научных работ — он трижды лишился федеральной поддержки в периоды президентства Эйзенхауэра и Джонсона, а также был несколько лет подвержен визовым ограничениям при выезде за границу.

Награды. Кроме Нобелевской премии, Луриа удостоен ряда наград, в основном от государственных и научных организаций США. Он получил премию Луизы Гросс-Хорвиц Колумбийского университета — вместе с М. Дельбрюком (1969). Он был избран членом Американской академии микробиологии, Национальной академии наук США, Американской академии искусств и наук, Американской ассоциации содействия развитию науки, Американского общества биохимиков и молекулярных биологов, Американского общества генетиков и др. В 1967–1968 гг. был избран президентом Американского микробиологического общества. В 1991 году награжден высоким американским знаком отличия — Национальной научной медалью. Страна, где он родился, также отметила его: он удостоен премии Ленги Итальянской национальной академии наук (1965).

Труды. С. Луриа является автором сравнительно небольшого числа работ — более 150, однако его эпистолярное наследие следует признать довольно значимым. Им изданы 5 книг: лекции по биологии для студентов [6]; научно-популярная книга «Жизнь: неоконченный эксперимент» (1973), удостоенная национальной книжной премии (1974) (она, кстати, переведена на 5 языков) [9]; довольно подробная автобиография (1984) [7], а также руководство «General Virology» [12] и научно-популярная книга «A View of Life» [21]. Луриа

был членом редсоветов ряда журналов, в том числе «Journal of Bacteriology», «Journal of Molecular Biology», «Proceedings of the National Academy of Sciences».

Полная библиография его работ и биографических материалов имеется на сайтах:

- Papers of Nobel Laureate Salvador E. Luria Added to Profiles in Science Web Site (<http://www.nih.gov/news/pr/sep2005/nlm-13.htm>) [23].
- Profiles in Science: National Library of Medicine (<http://profiles.nlm.nih.gov/ps/browse/ResourceBrowse/CID/QL/p-sort/chron/TYPE>) [25].
- Salvador E. Luria Papers: American Philosophical Society (<http://www.amphilsoc.org/mole/view?docId=ead/Mss.Ms.Coll.39-ead.xml;query=&brand=default>) [26].

Биография ученого отражена в ряде печатных источников [3–5, 22, 27, 28] и в электронной форме [33–36]. Представляют интерес в этом плане и биографии других членов «фаговой тройки» — М. Дельбрюка и А. Херши [1, 2], в которых можно также почерпнуть некоторые данные о жизни и творчестве С. Луриа.

Литература

1. Воробьев В.С. Макс Дельбрюк — путь от физики к биологии: к 100-летию со дня рождения и 25-летию со дня смерти // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2006. — Т. 2. — № 3. — С. 68–77.
2. Воробьева О.В. К 100-летию со дня рождения Алфреда Херши, одного из основателей молекулярной биологии // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2008. — Т. 4. — № 3. — С. 64–68.
3. Лауреаты Нобелевской премии: Энциклопедия / Пер. с англ. В 2-х т. — М.: Прогресс, 1992. — Т. 1. — С. 722–725.
4. Марьянович А.Т., Князькин И.В. Взрыв и цветение. Нобелевские премии по медицине 1901–2002. — СПб.; Издательство ДЕАН, 2003. — С. 115–123.
5. Bertani G. Salvador Edward Luria (1912–1991) // Genetics. — 1992. — Vol. 131. — P. 1–4.
6. Luria S. 36 Lectures in Biology. — Cambridge, Mass.: MIT Press, 1975. — 439 с.
7. Luria S. A Slot Machine, a Broken Test Tube: an Autobiography. — Harper & Row, New York, 1984. — 228 p.
8. Luria S. and Delbrueck M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance // Genetics. — 1943. — Vol. 28. — P. 491–511.

9. *Luria S.* Life, the Unfinished Experiment. — Charles Scribner's Sons, New York, 1973. — 127 p.
10. *Luria S.E. and Exner F.N.* The activation of bacteriophages by X-rays: influence of the medium // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1941. — Vol. 27. — P. 370–375.
11. *Luria S.E. and Human M.L.* A non-hereditary, host-induced variation of bacterial viruses // J. Bacteriol. — 1952. — Vol. 64. — P. 557–569.
12. *Luria S.E.* General Virology. — John Wiley & Sons Inc., 1953. — XIV, 427 p. (были переиздания: *Luria S.E., Darnell J.E.* General Virology. 2nd ed. — NY: Wiley, 1967. — XV, 512 p.; *Luria S.E., Darnell J.E., Baltimore D., Campbell A.* General Virology. 3rd ed. — John Wiley & Sons, 1978. — 578 p.; *Luria S.E.* General Virology. — Nabu Press, 2011. — 454 p.).
13. *Luria S.E.* Host-induced modifications of viruses // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. — 1953. — Vol. 18. — P. 237–244.
14. *Luria S.E.* Mutations of bacteria and of bacteriophage / In: Phage and the Origins of Molecular Biology. Ed. by J. Cairns, G.S. Stent and J.D. Watson. — Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1966. — P. 173–179.
15. *Luria S.E.* Mutations of bacterial viruses affecting their host range // Genetics. — 1950. — Vol. 30. — P. 84–99.
16. *Luria S.E.* Phage, Colicins and Macroregulatory Phenomena / In: Nobel Lectures in Molecular Biology, 1933–1975. Ed. by David Baltimore. — New York, Elsevier, 1977.
17. *Luria S.E.* Spontaneous bacterial mutations to resistance to antibacterial agents // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. — 1946. — Vol. 11. — P. 130–137.
18. *Luria S.E.* The frequency distribution of spontaneous bacteriophage mutants as evidence for exponential rate of phage reproduction // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. — 1951. — Vol. 16. — P. 463–470.
19. *Luria S.E., and Anderson T.F.* The identification and characterization of bacteriophages with the electron microscope // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1942. — Vol. 28. — P. 127–130.
20. *Luria S.E., Delbrueck M., and Anderson T.F.* Electron microscope studies of bacterial viruses // J. Bacteriol. — 1943. — Vol. 46. — P. 57–76.
21. *Luria S.E., Gould S.J., Singer S.* A View of Life. — Menio Park, CA: Benjamin/Cummings Pub. Co., 1981. — XIX, 806 p.
22. *Olby R.R.* The origins of molecular genetics // J. Hist. Biol. — 1974. — Vol. 7(1). — P. 93–100.
23. Papers of Nobel Laureate Salvador E. Luria Added to Profiles in Science Web Site (<http://www.nih.gov/news/pr/sep2005/nlm-13.htm>).
24. Phage and the Origins of Molecular Biology / Ed. by J. Cairns, G.S. Stent and J.D. Watson. — Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1966. — 366 p. (Revised and expanded ed., 1992; The Centennial Edition, 2007).
25. Profiles in Science: National Library of Medicine (<http://profiles.nlm.nih.gov/ps/browse/ResourceBrowse/CID/QL/p-sort/chron/TYPE>).
26. Salvador E. Luria Papers: American Philosophical Society (<http://www.amphilsoc.org/mole/view?docId=ead/Mss.Ms.Coll.39-ead.xml;query=&brand=default>).
27. *Stent G.S.* Molecular Genetics: An Introductory Narrative. — San Francisco, W.H. Freeman, 1971.
28. *Susman M.* The Cold Spring Harbor Phage Course (1945–1970): A 50th Anniversary Remembrance // Genetics. — 1995. — Vol. 139. — P. 1101–1106.
29. *Timofeeff-Ressowsky N.W., Zimmer K.G., Delbrueck Max.* Ueber die Natur der Genmutation und der Genstruktur // Nachr. Ges. Wiss. Goettingen, Math.-Phys. Klasse, Fachgr. 6, N.F. — 1935. — Bd. 1. — N 13. — S. 189–245.
30. *Watson J.D.* Growing up in the Phage Group / In: Phage and the Origins of Molecular Biology. Ed. by J. Cairns, G.S. Stent and J.D. Watson. — Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1966. — P. 239–245.
31. *Watson J.D.* Salvador E. Luria (1912–1991) // Nature. — 1991. — Vol. 350. — P. 113.
32. *Wollman E., Holweck F. and Luria S.* Effect of radiations on bacteriophage C16 // Nature. — 1940. — Vol. 145. — P. 935.
33. www.en.wikipedia.org/wiki/Salvador_Luria.
34. www.encyclopedia.com/topic/Salvador_Edward_Luria.aspx.
35. www.nndb.com/people/568/000082322.
36. www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1969/luria-bio.html.

Резюме. В связи со 100-летием со дня рождения Сальвадора Луриа (1912–1991), выдающегося итало-американского ученого, анализируются его жизнь и творчество. Он является одним из основателей молекулярной биологии, лауреатом Нобелевской премии. В статье рассматриваются исторические факты о деятельности знаменитой «фаговой тройки» — М. Дельбрюка, А. Херши и С. Луриа, которые своими ключевыми экспериментами способствовали прогрессу молекулярно-биологических исследований.

Ключевые слова: молекулярная биология, история, биографии, Сальвадор Луриа.

ON THE 100TH ANNIVERSARY OF THE BIRTH OF THE MOLECULAR BIOLOGIST SALVADOR LURIA

V.S. VOROBYEV

Yu.A. Ovchinnikov Russian Biotechnology Society, Moscow

In connection with the 100th anniversary of the birth of Salvador Luria (1912–1991), the outstanding Italian-American scientist, examines his life and work. He is one of the founders of molecular biology, a Nobel Prize. The article deals with the historical facts about the activities of the famous «phage three» – M. Delbrueck, A. Hershey and S. Luria, who with their key experiments to promote the progress of molecular biology research.

Keywords: molecular biology, history, biography, Salvador Luria.

СОБЫТИЯ 2012 ГОДА

**Итоги парламентских слушаний
на тему «Законодательное регулирование оборота
генетически модифицированных продуктов
в Российской Федерации», проведенных
в Государственной Думе ФС РФ
(Москва, 7 июня 2012 г.)**

7 июня 2012 года в Москве Государственной Думой Федерального Собрания Российской Федерации были организованы парламентские слушания на тему «Законодательное регулирование оборота генетически модифицированных продуктов в Российской Федерации». Состоялось всестороннее обсуждение данной проблемы с участием законодателей, представителей органов исполнительной власти, специалистов, экспертов. По итогам слушаний были приняты рекомендации, утвержденные решением Комитета Государственной Думы по науке и наукоемким технологиям от 17 сентября 2012 г. № 15-3.5. Ниже приводится текст этих рекомендаций.

РЕКОМЕНДАЦИИ

Участники слушаний, обсудив вопрос «Законодательное регулирование оборота генетически модифицированных продуктов в Российской Федерации», отмечают.

Производство и использование генно-инженерных продуктов в обеспечении питания населения представляет собой актуальную глобальную проблему, которая находится в центре внимания государственных и общественных структур, является неоднозначной и вызывает дискуссии в мировоззренческом, этическом и социально-экономическом плане.

Научно-технический прогресс последнего времени сделал реальностью широкое внедрение достижений биологии и биотехнологии в различные сектора экономики для решения задач здравоохранения, продовольственного обеспечения, сельского хозяйства, экологии, энергетики и т.д. Примером успешного, одобренного специалистами и обществом решения вопросов внедрения новых генно-инженерных технологий может служить применение таких биофармацевтических препаратов, как инсулины, интерфероны, гормоны, вакцины и др. Использование генетической инженерии в сельском хозяйстве для производства технических культур, например хлопка, также стало общепринятой современной нормой.

Что касается пищевого использования генетически модифицированных (ГМ) продуктов, то на протяжении

последних 30 лет это является предметом профессионального и общественного обсуждения.

В Российской Федерации создана система государственного регулирования использования биотехнологической продукции, ведется работа по совершенствованию законодательной, нормативной и методической базы для медико-биологической оценки безопасности и контроля за оборотом пищевой продукции из ГМО.

24 апреля 2012 года Председателем Правительства Российской Федерации В.В. Путиным утверждена Комплексная Программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года; распоряжением Правительства Российской Федерации от 17 апреля 2012 года № 559-р утверждена Стратегия развития пищевой и перерабатывающей промышленности Российской Федерации на период до 2020 года, Указом Президента Российской Федерации от 30 января 2010 г. утверждена Доктрина продовольственной безопасности Российской Федерации, распоряжением Правительства Российской Федерации от 25 октября 2010 г. № 1873-р утверждены Основы государственной политики Российской Федерации в области здорового питания населения на период до 2020 года.

Приняты федеральные законы:

- от 05.07.1996 г. № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности»;
- от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» и от 02.01.2000 № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов».

Изданы постановления Правительства Российской Федерации:

- от 21 декабря 2000 г. № 988 «О государственной регистрации новых пищевых продуктов, материалов и изделий»;
- от 16.02.2001 г. № 120 «О государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов»;
- от 1 января 2002 г. № 26 «О государственной регистрации кормов, полученных из генно-инженерно-модифицированных организмов».

В развитие данных документов вышел ряд других нормативно-правовых актов, методических документов, подготовленных Роспотребнадзором, Россельхознад-

зором, Таможенным союзом, другими ведомствами и организациями.

В Российской Федерации разрешено использование в питании населения 18 линий ГМО (4 линии сои, 10 линий кукурузы, 2 сорта картофеля, 1 линия риса, 1 линия сахарной свеклы); использование при производстве кормов — 14 линий ГМО (4 линии сои, 10 линий кукурузы).

Сельскохозяйственное выращивание ГМО в России не производится.

С 2004 года по 1 июля 2010 год Роспотребнадзором зарегистрировано 67 продуктов, полученных на основе генетически модифицированных организмов, в том числе генетически модифицированных микроорганизмов (ГММ). Из них с использованием ГМО зарегистрировано 20 продуктов (9 сортов кукурузы, 2 сорта картофеля, 4 сорта сои, 1 сорт сахарной свеклы, 1 сорт риса и 3 БАД), с использованием ГММ — 47 продуктов. Свидетельства о государственной регистрации на указанную продукцию действуют только на территории Российской Федерации до вступления в силу технических регламентов Таможенного союза, распространяющихся на данную продукцию (технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» ТР ТС 021/2011 вступает в силу с 1 июля 2013 года).

В связи с вступлением в силу Соглашения Таможенного союза по санитарным мерам с 1 июля 2010 года Роспотребнадзор осуществляет регистрацию продукции в соответствии с Разделом II Единого перечня товаров, подлежащих санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) на таможенной границе и таможенной территории Таможенного союза, утвержденного Решением Комиссии Таможенного союза от 28.05.2010 № 299, в который входят пищевые продукты, полученные с использованием генно-инженерно-модифицированных (трансгенных) организмов, в том числе генетически модифицированные микроорганизмы.

В рамках Таможенного союза Роспотребнадзором зарегистрировано 44 продукта, полученного на основе генетически модифицированных организмов (ГМО), в том числе генетически модифицированных микроорганизмов (ГММ). Из них с использованием ГМО зарегистрировано 19 продуктов (10 сортов кукурузы, 5 сортов сои, 1 сорт сахарной свеклы, 1 сорт риса и 2 БАД), с использованием ГММ — 25 продуктов.

Свидетельства о государственной регистрации на указанную продукцию действуют только на территории Российской Федерации до вступления в силу технических регламентов Таможенного союза, рас-

пространяющихся на данную продукцию (технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» ТР ТС 021/2011 вступает в силу с 1 июля 2013 года).

12 декабря 2007 года вступил в силу Федеральный закон от 25.10.2007 г. № 234-ФЗ «О внесении изменений в Закон Российской Федерации «О защите прав потребителей» и часть вторую Гражданского кодекса Российской Федерации», который в Закон Российской Федерации от 07.02.1992 № 2300-1 «О защите прав потребителей», который внес дополнение об обязательном наличии в отношении продуктов питания информации о наличии в них компонентов, полученных с ГМО, в случае, если содержание указанных организмов в таком компоненте составляет более 0,9%. Таким образом, Закон Российской Федерации от 07.02.1992 № 2300-1 «О защите прав потребителей» был гармонизирован с требованиями Европейского Союза по этикетированию пищевых продуктов, полученных из ГМО, установленными Директивой Европейского Парламента и Совета от 22.09.2003 № 1829/2003 «О генетически модифицированной пище и кормах», которая с апреля 2004 г. ввела в странах Европейского Союза 0,9% пороговый уровень для этикетирования пищевых продуктов, полученных из ГМО.

Указанные требования по этикетированию пищевых продуктов, содержащих ГМО, имеются в Разделе 1 «Требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю), утвержденных Решением Комиссии Таможенного союза от 28 мая 2010 г. № 299.

При выявлении случаев нарушения маркировки пищевых продуктов о наличии ГМО принимаются меры в соответствии с действующим законодательством.

В 2000 году Госсанэпидслужбой разработана методическая база по оценке качества и безопасности для здоровья человека ГМ продовольственного сырья и пищевых продуктов. С этой целью Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации утверждены Методические указания МУК 2.3.2.970-00 «Медико-биологическая оценка пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников» в соответствии с которыми проводится санитарно-эпидемиологическая экспертиза пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников, а постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 08.11.2000

г. № 14 введено Положение о порядке проведения санитарно-эпидемиологической экспертизы пищевых продуктов, полученных из генетически модифицированных источников.

Медико-биологическая оценка пищевых продуктов, полученных из генетически модифицированных источников, включает в себя оценку возможных аллергенных, иммуномодулирующих и мутагенных свойств пищевого продукта, изучение показателей его качества (содержание белка и его аминокислотный состав, жира, углеводов, минеральных веществ и витамин) и безопасности (содержание тяжелых металлов и микотоксинов).

Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации 16.09.2003 № 149 введена санитарно-эпидемиологическая, микробиологическая и молекулярно-генетическая экспертиза пищевой продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов.

Методическая база исследования ГМО в пищевых продуктах включает самые современные методы, основанные на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР), методе гибридизации на биологическом микрочипе, ПЦР в режиме реального времени, иммуно-флуоресцентном анализе. Утверждены национальные стандарты Российской Федерации по методам контроля компонентов ГМО в пищевых продуктах.

В соответствии с международно-признанными подходами по оценке новых источников пищи (ФАО/ВОЗ, Директивы ЕС) пищевые продукты, полученные из ГМО, идентичные по показателям пищевой ценности и безопасности своим традиционным аналогам, признаны безопасными и разрешены для коммерческого использования.

Российская система оценки безопасности ГМО в настоящее время является одной из самых строгих в мире. Действующая в России система оценки безопасности ГМО охватывает более широкий спектр исследований, чем в других странах (США, Евросоюз) и включает в себя длительные токсикологические исследования на животных — 180 дней (Евросоюз — 90 дней), а также применение современных методов анализа, таких как, определение генотоксичности, геномный и протеомный анализы, оценка аллергенности на модельных системах и многое другое, что является дополнительным фактором, гарантирующим безопасность регистрируемых пищевых продуктов, полученных из ГМО.

В работу по оценке безопасности ГМО вовлечены ведущие научно-исследовательские учреждения РАМН (ФГБУ «НИИ питания» РАМН,

ФГБУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» РАМН, ФГБУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН, ФГБУ «ИБМХ» РАМН), Роспотребнадзора (ФГУН ФНЦ гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана, ФГУН ЦНИИ эпидемиологии, ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора), Минздравсоцразвития России (ГОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»), РАН (Центр «Биоинженерия»), РАСХН (Всероссийский научно-исследовательский институт зерна и продуктов его переработки РАСХН), Минобрнауки России (ФГБОУ ВПО «МГУПП»).

Анализ результатов научных исследований, проведенных в рамках процедуры регистрации ГМО в Российской Федерации, а также данных мировой научной литературы позволяет констатировать, что пищевые продукты, полученные из ГМО, прошедшие медико-биологическую оценку и зарегистрированные в установленном порядке, не отличаются по изученным свойствам от аналогов, полученных традиционными методами, являются безопасными для здоровья человека и разрешены для реализации населению и использования в пищевой промышленности без ограничений и их использование не вызовет нежелательных последствий для организма человека.

Таким образом, в Российской Федерации решены принципиально важные вопросы, позволяющие использовать ГМО для пищевых целей:

- созданы законодательная, нормативная и методическая базы, регулирующие оценку безопасности и контроль за оборотом ГМО;
- наличие научно-обоснованной доказательной базы отсутствия неблагоприятных эффектов для здоровья человека при употреблении пищевых продуктов, содержащих ГМО и зарегистрированных в установленном порядке;
- возможность контроля за оборотом этой продукции на продовольственном рынке страны.

Вместе с тем, не теряет актуальности проблема изучения влияния вновь создаваемых видов пищевых продуктов, полученных с использованием ГМО, на здоровье человека и его будущих поколений. Ее решение потребует долговременных эпидемиологических исследований, проведенных в соответствии со строгими общепринятыми протоколами. Существует также проблема ввоза на территорию Российской Федерации в рамках действующего Таможенного союза незарегистрированных в установленном порядке пищевых продуктов, полученных с использованием ГМО.

Сегодня в мире создано и доведено до испытаний в полевых условиях более 1000 линий генетически измененных растений, а около 200 из них допущено к промышленному производству. Доминирующими трансгенными культурами в мире являются соя, хлопок, рапс и кукуруза.

Отдельную проблему представляют собой создание и выращивание трансгенных сельскохозяйственных животных, микроорганизмов, грибов. В самостоятельный раздел генетической инженерии выделяется лесная биотехнология, призванная воссоздавать лесные ресурсы планеты.

Государству предстоит создать эффективную систему законодательного регулирования выпуска ГМО в окружающую среду, что приобретает особое значение в связи с планируемым вступлением в ВТО.

Участники парламентских слушаний рекомендуют:

I. Федеральному Собранию Российской Федерации:

1. Принять участие в работе по совершенствованию законодательства в сфере регулирования оборота генетически модифицированных продуктов и выпуска генетически модифицированных организмов в окружающую среду.

2. Принять участие в разработке проектов федеральных законов по реализации Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года.

II. Правительству Российской Федерации:

1. Продолжить работу по подготовке нормативных правовых актов, проектов федеральных законов в соответствии с Планом мероприятий по реализации Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года.

2. В целях обеспечения охраны здоровья населения, продовольственной и экологической безопасности рассмотреть вопрос об увеличении финансирования научных исследований в области биотехнологий, в том

числе направленных на изучение влияния пищевых продуктов, полученных с использованием ГМО, на здоровье человека.

3. Минсельхозу России совместно с РАН и РАСХН в рамках реализации приоритетных направлений развития науки и в соответствии с перечнем критических технологий «Технологии биоинженерии» (утверждено указом Президента Российской Федерации № 899 от 07.07.2011 г.) развернуть исследования по созданию линий ГМО, адаптированных для выращивания на территории Российской Федерации.

4. РАМН, Минздраву России, Роспотребнадзору продолжить совершенствование методических подходов к оценке безопасности ГМО; сформулировать основные принципы оценки безопасности и процедуры государственной регистрации ГМ культур 2-го и 3-го поколений.

5. Роспотребнадзору, Минсельхозу России, РАН, РАМН и РАСХН продолжить совершенствование методов контроля за обращением ГМО на продовольственном рынке Российской Федерации, в том числе — алгоритмов выявления и идентификации новых линий, не прошедших государственную регистрацию.

6. Минздраву России, Минсельхозу России, РАН, РАМН и РАСХН выйти с предложением о создании под эгидой ООН (ФАО и ВОЗ) объединенного Комитета экспертов ФАО/ВОЗ по новым и генетически модифицированным источникам пищи.

III. Органам государственной власти субъектов Российской Федерации:

1. Обеспечить нормативно-правовую, организационную и экономическую поддержку учреждениям и организациям, осуществляющим деятельность в сфере сельскохозяйственной биотехнологии.

*Председатель Комитета Государственной Думы по науке и наукоемким технологиям
В.А. Черешнев*

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 14.10.12
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 5,0. Тираж 1000 экз.

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР) создано в 2003 г., зарегистрировано Минюстом России.

Главными целями деятельности ОБР являются:

- содействие развитию биотехнологии в России как приоритетного направления научно-технического прогресса, основы повышения уровня жизни и благосостояния ее граждан;
- содействие сохранению научного и научно-технологического потенциала биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, достижению приоритета российской науки;
- обеспечение обмена научными идеями и научно-техническими достижениями, передовым производственным опытом;
- содействие развитию сотрудничества ученых, инженеров, специалистов с мировым научным и общественно-политическим сообществом;
- создание условий для творческой работы, роста профессионализма и компетентности, более полного использования интеллектуального потенциала членов организации в интересах развития науки и производства.

Для достижения этих целей ОБР осуществляет различные мероприятия, в том числе проводит конференции, симпозиумы, рабочие совещания. 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