

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

В.С. Воробьев, Т.Н. Гаева, С.И. Матаев, О.Я. Мезенова

Редакционный совет

В.А. Быков (Москва), В.Г. Дебабов (Москва), С.Х. Дегтярев (Новосибирск),
В.Т. Иванов (Москва), Л.В. Калакуцкий (Пушино), М.П. Кирпичников (Москва),
А.И. Мирошников (Москва), Т.В. Овчинникова (Москва), А.Н. Панин (Москва),
В.О. Попов (Москва), Н. Раевский (Берлин, Германия),
А.Н. Решетиллов (Пушино), 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

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

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. Р.Г. Василев 4

Оригинальные статьи

Сайт-специфическая эндонуклеаза SegD бактериофага T4: биохимические свойства.

А.С. Соколов, И.Э. Грановский 5

Генерация потенциала биотопливным элементом при использовании внутрисполостной жидкости травяной лягушки *Rana temporaria* в качестве электролита.

А.Н. Решетилев, А.Е. Китова, В.К. Утешев, Т.А. Решетилова, Р.Г. Василев 12

Изучение острой токсичности наноразмерной транспортной формы рифабутина.

И.Г. Кузнецова, С.Е. Северин, Г.Г. Барсегян, Е.А. Журжа 17

Закономерности процесса термической инактивации инулиназ из *Helianthus tuberosus*.

М.Г. Холявка, Т.А. Ковалева, Е.А. Хрупина, В.Г. Артюхов, В.Н. Калаев 21

Конвертерное накопление электрической энергии, генерируемой биотопливным элементом микроваттной мощности.

А.Н. Решетилев, А.Е. Китова, А.А. Ивахненко, П.М. Готовцев, Р.Г. Василев, М.А. Гуторов 27

Применение низкомолекулярного хитозана как адъюванта в технологии получения антитоксических противохолерных сывороток.

М.В. Овчинникова, Е.Г. Абрамова, М.Н. Киреев 33

Обоснование показателей безопасности для икры летучих рыб сушеной и соленой сушеной.

Е.А. Ахмерова, Л.Р. Копыленко, Л.Д. Курлапова 37

Обзоры

Импедансная спектроскопия в современных электрохимических ДНК-биосенсорах.

С.Е. Тарасов, В.В. Емец, М.А. Гуторов, А.Н. Решетилев 43

Перспективы использования стволовых клеток для выращивания искусственного мяса по технологии *in vitro*.

Ю.А. Иванов, Г.К. Толоконников, Е.Б. Петров, В.Ю. Сидорова 51

Страницы истории

К 75-летию со дня рождения крупного иммунолога и молекулярного биолога Сусуму Тонегавы.

О.В. Воробьева, В.С. Воробьев, Р.Г. Василев 58

Хроника

События 2014 года 74

Правила для авторов 78

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. R.G. Vasilov 4

Original articles

Site specific endonuclease SegD of bacteriophage T4: biochemical properties.

A.S. Sokolov, I.E. Granovsky..... 5

Generation of potential by biofuel cells using intracavitary fluid grass frog *Rana temporaria* as an electrolyte.

A.N. Reshetilov, A.E. Kitova, V.K. Uteshev, T.A. Reshetilova, R.G. Vasilov 12

A study of the acute toxicity of rifabutin nanosized transport form.

I.G. Kuznetsova, S.E. Severin, G.G. Barsegyan, E.A. Zhurzha 17

Laws of process heat inactivation of inulinase from *Helianthus tuberosus*.

M.G. Holyavka, T.A. Kovaleva, E.A. Hrupina, V.G. Artyukhov, V.N. Kalaev 21

Converter accumulation of electrical energy generated by biofuel cells microwatt power.

A.N. Reshetilov, A.E. Kitova, A.A. Ivahnenko, P.M. Gotovtsev, R.G. Vasilov, M.A. Gutorov 27

The use of low molecular weight chitosan as an adjuvant in the production technology antitoxic sera cholera.

M.V. Ovchinnikova, E.G. Abramova, M.N. Kireev 33

Justification of safety performance for flying fish roe dried and salted dried.

E.A. Ahmerova, L.R. Kopylenko, L.D. Kurlapova 37

Reviews

Impedance spectroscopy in modern electrochemical DNA biosensors.

S.E. Tarasov, V.V. Emets, M.A. Gutorov, A.N. Reshetilov 43

Prospects for the use of stem cells to grow artificial meat technology in vitro.

Y.A. Ivanov, G.K. Tolokonnikov, E.B. Petrov, V.Y. Sidorova..... 51

Pages of history

On the 75th anniversary of a major immunologist and molecular biologist Susumu Tonegawa.

O.V. Vorobyeva, V.S. Vorobyev, R.G. Vasilov 58

The chronicle

Events in 2014 74

Rules for authors 78

К читателям

В третьем номере за 2014 год помещена подборка работ профессора А.Н. Решетилова с коллегами, посвященная вопросам разработки биотопливных элементов. В статье «Генерация потенциала биотопливным элементом при использовании внутриполостной жидкости травяной лягушки *Rana temporaria* в качестве электролита» (авторы из Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Института биофизики клетки РАН, Национального исследовательского центра «Курчатовский институт») показана возможность функционирования микробных клеток в качестве биоматериала анода при использовании внутриполостной жидкости лягушки. Теми же авторами представлена работа «Конвертерное накопление электрической энергии, генерируемой биотопливным элементом микроваттной мощности», в которой микробный биотопливный элемент (БТЭ) использовали как первичный источник в системе сбора электрической энергии на основе конвертера ВQ25504. Разработанная система сбора на основе конвертера позволяла поднимать начальное напряжение БТЭ от 0,5 В до результирующего 3,1 В. Также дан обзор С.Е. Тарасова, В.В. Емец, М.А. Гуторова, А.Н. Решетилова, посвященный возможностям применения ДНК-биосенсоров на основе электроимпедансной спектроскопии.

В исследовании «Сайт-специфическая эндонуклеаза SegD бактериофага T4: биохимические свойства» (авторы — А.С. Соколов, И.Э. Грановский из Пущино) определены физико-химические особенности работы сайт-специфической эндонуклеазы SegD и изучена стабильность фермента при различных условиях.

В статье «Изучение острой токсичности наноразмерной транспортной формы рифабутина» (Кузнецова И.Г. и др., Москва) выявлено, что при введении исследуемой формы мышам и крысам препарат вызывает малотоксичное действие (4-й класс), ЛД₅₀ находится в интервале 500–5000 мг/кг.

Воронежскими авторами (Холявка М.Г. и др.) изучены закономерности процесса термической инактивации инулиназ из *Helianthus tuberosus*. Продемонстрировано, что все три фракции фермента перспективны для промышленных целей из-за устойчивости к действию высоких температур.

Работа М.В. Овчинниковой (Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов) показала эффективность применения биополимера хитозана в качестве адъюванта при получении высокоактивных антисывороток к холерному токсину. Использование биополимера позволило сократить общую продолжительность иммунизации, исключив процедуру бустирования.

В статье Е.А. Ахмеровой с соавторами (РУДН, ВНИРО) приведены результаты исследований икры-полуфабриката летучих рыб и рекомендуемые допустимые уровни микробиологических показателей.

В обзорной работе Ю.А. Иванова с коллегами (Всероссийский НИИ механизации животноводства, Москва) рассмотрены возможности применения мультипотентных мехенхимных стволовых клеток и миосателлитов для выращивания искусственного мяса *in vitro*.

В исторической рубрике помещена статья к 75-летию со дня рождения крупного иммунолога и молекулярного биолога С. Тонегавы. Представлены биографические сведения в связи с памяtnыми датами В.А. Энгельгардта, А.Н. Несмеянова, а также материал к 70-летию публикации статьи О. Эйвери о роли ДНК в передаче наследственности.

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

САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДУКЛЕАЗА *SegD* БАКТЕРИОФАГА Т4: БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

А.С. СОКОЛОВ^{1*}, И.Э. ГРАНОВСКИЙ²

¹ФГБУН «Институт биологического приборостроения РАН»,

²ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН»,
Пушино Московской области

Ген *segD* бактериофага Т4 расположен между генами 23 и 24, кодирующими основные белки капсида. На основании общей гомологии N-концевой части закодированного белка и наличия вырожденного варианта мотива GY-YIG данный белок был отнесен к группе Seg-белков семейства хоминг-эндонуклеазы GY-YIG. В настоящей работе мы разработали простую и эффективную схему получения сайт-специфической эндонуклеазы *SegD*. Были определены физико-химические особенности работы эндонуклеазы *SegD* и изучена стабильность фермента при различных условиях. Фермент активен в широком диапазоне значений pH, с максимумом при pH 7,0–7,5. Температурный оптимум работы для сайт-специфической эндонуклеазы *SegD* находится в области 30 °С. Подобно другим хоминг-эндонуклеазам, активность *SegD* проявляется в присутствии двухвалентных ионов Mg²⁺ и Mn²⁺. Присутствие катионов Na⁺ и K⁺ в реакционной смеси в концентрации выше 50 мМ уменьшает эндонуклеазную активность.

Ключевые слова: бактериофаг Т4, сайт-специфическая эндонуклеаза *SegD*, убиквитин, клонирование, биохимические свойства.

Введение

Хоминг-эндонуклеазы относятся к уникальному классу сайт-специфических эндонуклеаз. Характерной особенностью данных ферментов является способность узнавать протяженные (14–44 п.н.), часто асимметричные, вырожденные последовательности ДНК [8]. Как правило, эти эндонуклеазы вносят одно-, либо двунитевой разрыв в родственную аллель, не содержащую ген хоминг-эндонуклеазы (*heg*⁻), недалеко от места встраивания. Процесс репарации разрыва ДНК в реципиентном геноме запускает перенос генетической информации из *heg*⁺ аллеля в *heg*⁻ и приводит к наследованию обеими аллелями гена хоминг-эндонуклеазы [15, 17].

Ранее при секвенировании генома бактериофага Т4 была установлена группа генов, кодирующих небольшие, от 198 до 229 а.о., основные белки, проявляющие высокую степень подобия первых 100 а.о. [13]. Кроме

того, в белках был обнаружен вырожденный вариант мотива GY-YIG, характерный для ферментов, расщепляющих фосфодиэфирную связь в молекуле ДНК [7]. Наиболее близкими по гомологии и размеру к обнаруженным белкам оказались хоминг-эндонуклеазы мобильных интронов группы I, например, такие как I-TevI и др. [11]. В связи с этим было сделано предположение, что белки данной группы также являются хоминг-эндонуклеазами, и они были названы Seg-белками (similar to endonucleases of group I introns). Впоследствии для белков SegA, B, C, E, F и G было показано, что они являются сайт-специфическими эндонуклеазами, вносящими двунитевые разрывы в их ДНК-мишени. Для всех них, за исключением SegA, была продемонстрирована способность инициировать хоминг собственных генов [5, 6, 9, 10].

Белок *SegD* бактериофага Т4 является одним из представителей группы Seg-белков. Ранее нами было обнаружено, что белок экспрессируется в ходе развития бактериофага Т4. В локусе генов 23-24 не далеко от точки инсерции гена *segD*, был найден сайт гидролиза эндонуклеазы *SegD*. Сайт расщепления эндонуклеазы *SegD* расположен в консервативной 3'-области гена 23 на расстоянии 52 п.н. от конца ОРС *SegD*. Причем сайты гидролиза в случае Т4 и родственных фагов, не содержащих *segD*, оказались идентичны. Также нами была исследована способность эндонуклеазы *SegD* ини-

© 2014 г. Соколов А.С., Грановский И.Э.

* Автор для переписки:

Соколов Андрей Сергеевич

научный сотрудник лаборатории новых методов в биологии
Института биологического приборостроения РАН

142290 Московская область, г. Пушино, ул. Институтская, 7

Тел./Факс: +7 (4967) 31-8972, 31-8965; +7 (4967) 33-0522

E-mail: 212sok@rambler.ru

цировать мобильность собственного гена. Оказалось, что, в отличие от других представителей Seg-белков, эндонуклеаза SegD не способна инициировать мобильность собственного гена при скрещивании родственных *segD*⁺ и *segD*⁻-бактериофагов.

В настоящей работе мы продолжили изучение сайт-специфической эндонуклеазы SegD с точки зрения биохимических особенностей работы фермента. Поэтому целью данного исследования является разработка простой и эффективной схемы получения сайт-специфической эндонуклеазы SegD, а также определение особенностей работы фермента и характеристика его основных биохимических свойств.

Материалы и методы

В работе использовались штаммы *E. coli* BL21(DE3)/pLysE и Top10. Экспрессионный вектор pHUE подробно описан в работе [4]. Бактериофаги T4 и T2L любезно предоставлены В.И. Тяншиным (ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН). Эндонуклеазы рестрикции Sfr303I (изошизомер SacII), SspI, EcoRI, HindIII и ДНК-лигаза бактериофага T4 — коммерческие препараты фирмы Fermentas.

Конструирование плазмид. Экспрессионная плазида pHUESegD содержит последовательность ДНК, кодирующую ОРС SegD (GenBank Z69340) длиной 672 п.н. Последовательность ДНК, кодирующая SegD, была клонирована в той же рамке считывания с фрагментом ДНК, кодирующим N-терминальную полигистидиновую последовательность («His₆-tag») и последовательность убиквитина (Ub). Для получения данной плазмиды ДНК бактериофага T4 была амплифицирована с праймерами к концам последовательности ОРС SegD: прямой — 5'-GGGCTCCGCGGTGGTATGTTTAAAATGAAATATTTAATAT-3', обратный — 5'-TTCGGATCCTTTTТАСТАТТТТАТАС-GATAGC-3' (выделены участки узнавания Sfr303I и BamHI), гидролизована эндонуклеазами рестрикции Sfr303I и BamHI и клонирована в экспрессионный вектор pHUE. Полученная рекомбинантная плазида была проверена секвенированием.

Плазида pUT2LsD содержит фрагмент области генов 23-24 бактериофага T2L, кодирующих основные белки капсида, и в данной работе использовалась в качестве субстратной ДНК для определения активности эндонуклеазы SegD. Данная плазида содержит фрагмент ДНК размером 1,4 т.п.н., который был амплифицирован при помощи ПЦР с использованием праймеров:

5'-ТТААГСТТАСГАГАТТТААСТГС-3' и 5'-ТГ-ГААТТСТГГСТАСАГАААТТАТГ-3', и клонирована по сайтам EcoRI и HindIII в плазмиду pUC18 [19]. Процедуры клонирования и ПЦР проводили при помощи стандартных методов [12].

Экспрессия ОРС *segD* в *E. coli*. Экспрессию проводили по методу, предложенному Штадиером [14] с некоторыми модификациями. Рекомбинантной плазмидой pHUESegD трансформировали клетки *E. coli* BL21(DE3)/pLysE. Клетки высевали на чашки с агаризованной средой LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), хлорамфениколом (34 мкг/мл) и 0,2% глюкозы. Клетки выращивали в течение ночи при 37 °С. Затем клетки суспендировали в среде LB и полученной суспензией инокулировали 1 л среды 2×YT с ампициллином (100 мкг/мл) и хлорамфениколом (34 мкг/мл). Культуру растили при 25 °С до ОД₅₉₀ равной 1, добавляли ИПТГ до концентрации 0,25 мМ, и продолжали инкубировать в тех же условиях еще 2,5 ч. Далее клетки осаждали центрифугированием и хранили клеточную биомассу до момента выделения белка при -70 °С.

Выделение эндонуклеазы SegD. Все этапы очистки проводили при 4 °С. Клетки разрушали в присутствии ингибитора протеаз PMSF (0,5 мМ) на клеточном дезинтеграторе высокого давления (френч-пресс). Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 39000 × g в течение 30 мин. Осветленный лизат наносили на колонку, с 0,5 мл сорбента «Ni-Sepharose 6 Fast Flow» (GE-Healthcare), уравновешенную буфером для посадки (25 мМ Na-фосфата, рН 8; 500 мМ NaCl; 0,1 мМ 2-меркаптоэтанола). Колонку промывали 50 мл буфера для промывки, содержащего дополнительно 0,5 М NaCl. Белок элюировали 6 мл буфера для элюции, содержащем 20 мМ Трис-НСl рН 7,6; 0,1 мМ 2-меркаптоэтанола; 150 мМ NaCl и 350 мМ имидазола. Далее с целью удаления дополнительных N-концевых остатков «His₆-tag» и последовательности убиквитина целевую фракцию белка обрабатывали Usp2 протеазой. Данная протеаза узнает молекулу убиквитина и вносит разрыв в аминокислотную последовательность между убиквитином и целевым белком [4]. К фракции, содержащей SegD, добавляли Usp2 протеазу и проводили диализ против 1 л буфера (20 мМ Трис-НСl рН 7,6; 1 мМ 2-меркаптоэтанола; 150 мМ NaCl; 0,1 мМ MgCl₂ и 25 мМ имидазола) в течение ночи. Количество добавленной Usp2 протеазы определялось молярным соотношением фермент/субстрат как 1/50. Следующим этапом очистки было удаление из препарата эндонуклеазы SegD протеазы Usp2, имеющей в своем составе «His₆-tag». Для этого препарат SegD после диа-

лиза наносили на колонку с 0,5 мл «Ni-Sepharose 6 Fast Flow (GE)», уравновешенную буфером для диализа. Целевую фракцию SegD, находящуюся в проскоке, собирали и последовательно диализовали против 800 мл буфера, содержащего 20 мМ Трис-НСl рН 7,6; 1 мМ 2-меркаптоэтанола; 150 мМ NaCl; 0,1 мМ MgCl₂ и 100 мл буфера для хранения, содержащего 20 мМ Трис-НСl рН 7,6; 100 мМ NaCl; 10 мМ 2-меркаптоэтанола; 0,1 мМ ЭДТА и 50% (об./об.) глицерина. Препарат фермента хранили при -20 °С.

Концентрацию белка определяли по поглощению при λ_{280} нм из расчета, что поглощение раствора SegD с концентрацией 1,14 мг/м равно 1 ОЕ. Электрофорез белков проводили в 12%-ном ПААГ по методу Лэммли.

Анализ эндонуклеазной активности SegD. Стандартная реакционная смесь содержала 50 мМ Трис-НСl рН 7,5; 10 мМ MgCl₂; 10 мМ β -меркаптоэтанола; 0,1 мг/мл БСА; 0,02% Тритона X-100 и 0,2 мкг ДНК плазмиды pUT2LsD, линейризованной эндонуклеазой рестрикции SspI, а также 1 ед. активности эндонуклеазы SegD в объеме 10 мкл. Реакцию проводили при 30 °С в течение 30 мин. и останавливали добавлением ЭДТА до концентрации 50 мМ с последующим охлаждением во льду. За одну единицу активности SegD было принято количество фермента, необходимое для 50% расщепления 0,2 мкг ДНК плазмиды pUT2LsD в стандартных условиях.

При изучении влияния на гидролиз таких факторов, как: рН, ионная сила, температура, концентрация Mg²⁺, БСА и Тритон X-100, соответствующие компоненты, либо условия реакции варьировали относительно стандартных. При определении оптимума рН гидролиз в диапазоне рН 6–6,5 проводили в 50 мМ MES; рН 7,0 – в 50 мМ HEPES; рН 7,5–8,5 – в 50 мМ Трис-НСl и при рН 9–10,0 – в 50 мМ Трис-глицин.

В экспериментах по анализу влияния на стабильность SegD таких веществ, как БСА, Тритон X-100, белок разводили в буфере для разведения (20 мМ Трис-НСl рН 7,5; 100 мМ KCl; 0,1 мМ ЭДТА; 10 мМ 2-меркаптоэтанола) в отсутствие, либо в присутствии соответствующего компонента. Далее белок инкубировали при 30 °С и отбирали аликвоты через 0, 10, 30, 60 и 120 мин. после начала инкубации для определения активности SegD.

При изучении влияния на активность эндонуклеазы SegD температуры гидролиз субстратной ДНК проводили в стандартных условиях реакции в диапазоне температуры от 10 до 50 °С.

Продукты реакции разделяли в 1% агарозном геле и окрашивали бромистым этидием. Далее оценивался процент гидролизованной субстратной ДНК. Для этой цели использовалась система геля документирования Kodak EDAS 290. Полученные электронные данные обсчитывались в программе OptiQuant. На рисунках представлены данные, полученные в трех независимых экспериментах.

Результаты и обсуждение

ОРС segD (acc. No Z69340.1) бактериофага T4, длиной 672 п.н., расположена между генами 23 и 24. Данная ОРС кодирует небольшой по размеру белок, состоящий из 223 а.о. Эндонуклеаза SegD обогащена положительно заряженными аминокислотами, поэтому рассчитанная изоэлектрическая точка белка сдвинута в щелочную область и соответствует 9,7 (http://web.exrasy.org/compute_pi/) и при нейтральном значении рН белок имеет положительный заряд. Поскольку SegD является ДНК-гидролизующим ферментом, положительный заряд белка, по-видимому, способствует его взаимодействию с ДНК мишенью.

Как показал компьютерный анализ, проведенный с помощью базы данных InterPro, молекула SegD состоит из двух доменов – GIY-YIG каталитического и ДНК-связывающего. Похожие принципы организации отмечены и для других представителей GIY-YIG семейства хоминг-эндонуклеаз, таких как SegB [2] и I-TevI [18].

В С-концевой области белка, включающей ДНК-распознающий домен, обнаруживается мотив NUMOD3 (Nuclease-associated modular DNA-binding domains motifs), который также участвует в узнавании ДНК [14]. Данный мотив (ДНК-распознающий мотив NUMOD3) обнаружен и у других представителей семейства GIY-YIG хоминг-эндонуклеаз, таких как SegB, SegC, I-TevI и I-VmoI, а также белка MobC – представителя семейства хоминг-эндонуклеаз H-N-H, что свидетельствует об универсальности данного ДНК-узнающего модуля [14]. По-видимому, в случае GIY-YIG и H-N-H семейств хоминг-эндонуклеаз уникальный ДНК-узнающий участок молекулы эндонуклеазы может формироваться в результате комбинаторных событий с использованием более мелких ДНК-распознающих модулей [1].

Экспрессия и очистка эндонуклеазы SegD. Выделению и характеристике различных белков предшествует обычно конструирование штаммов-продуцентов этих белков. Работа с эндонуклеазами осложняется их высокой токсичностью, низкими выходами и частичной,

либо полной, локализацией целевого белка в тельцах включения. Учитывая это, для создания продуцента белка SegD мы использовали вектор pHUE [4]. Данный вектор позволяет нарабатывать целевые белки, слитые на N-конце с дополнительным аминокислотным довеском, состоящим из шести остатков гистидина и убиквитина. Как показано ранее, убиквитин является стабильным хорошо экспрессирующимся белком-партнером и может стабилизировать белки, слитые с ним [4]. Поэтому, чтобы повысить растворимость эндонуклеазы SegD в клетках *E. coli* и упростить процедуру выделения, ген *segD* был клонирован в одной рамке считывания с убиквитином. Поскольку хоминг-эндонуклеазы могут быть токсичными для клеток, мы выбрали для экспрессии штамм *E. coli* BL21(DE3)/pLysE. Плазмиды pLysE содержит ген лизоцима бактериофага T7 — природный ингибитор РНК-полимеразы фага T7, предотвращающий преждевременную транскрипцию.

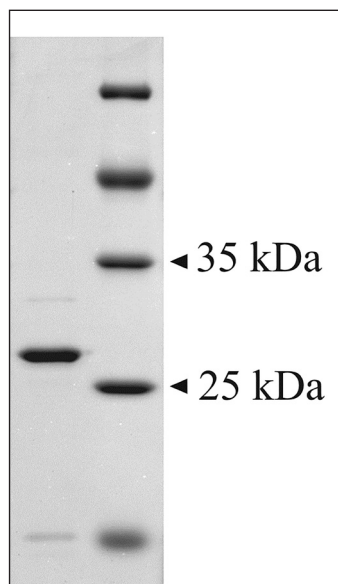


Рис. 1. Электрофореграмма очищенного препарата эндонуклеазы SegD. Электрофоретическое разделение очищенного препарата белка SegD проведено в 15% ПААГ. Справа приведены маркеры молекулярных масс

Наличие на N-конце химерного белка «His₆-tag» позволило использовать аффинную хроматографию на металл-хелатном сорбенте, что максимально упростило процедуру выделения эндонуклеазы SegD. Поскольку мы использовали убиквитин как белок партнер, это позволило на втором этапе полностью удалить His₆-убиквитиновый довесок с использованием деубиквитирующей протеазы Usp2 [4]. Данная протеаза узнает пространственную структуру молекулы убиквитина и

вносит разрыв между убиквитином и целевым белком. Разрыв вносится таким образом, что на N-конце эндонуклеазы SegD не остается дополнительных аминокислотных остатков. Электрофорез очищенного фермента в ПААГ показал наличие преимущественно одной полосы в препарате белка SegD (рис. 1). Определенная на основании электрофоретической подвижности молекулярная масса белка (28 кДа) отличается от расчетной (25,7 кДа). Это свойство ранее уже отмечалось [3] и характерно для ряда представителей Seg-белков. Аномальная электрофоретическая подвижность, по видимому, связана с высокой изоэлектрической точкой данных белков.

Изучение влияния pH и температуры на активность эндонуклеазы SegD. Для изучения биохимических свойств фермента мы проводили эксперименты по определению эндонуклеазной активности SegD *in vitro* при различных условиях. Как известно, ферменты очень чувствительны к значению pH среды, при котором они действуют. При определении зависимости ферментативной активности эндонуклеазы SegD от pH оценивали процент гидролиза субстратной ДНК в различных буферных системах. Эндонуклеаза SegD активна в широком диапазоне pH от 6,5 до 9 (рис. 2А). При этом гидролиз практически отсутствовал при pH 5, а наибольшая ферментативная активность эндонуклеазы SegD наблюдается при pH 7–7,5. Таким образом, эндонуклеаза SegD в отличие от близкородственных хоминг-эндонуклеаз SegB [2] и SegE [17], проявляющих наибольшую активность при pH 8, обладает оптимумом pH, сдвинутым в нейтральную область.

На рисунке 2Б приведена зависимость активности эндонуклеазы SegD от температуры. Максимальная активность SegD наблюдалась в диапазоне температур 25–30 °С, что соответствует температурному оптимуму активности родственных ферментов SegB [2] и SegE [3]. Снижение температуры реакционной смеси до 15 °С приводило к 1,5-кратному снижению ферментативной активности. При температуре реакции выше 40 °С происходило существенное снижение активности фермента вследствие его тепловой денатурации.

Влияние ионов металлов на активность эндонуклеазы SegD. Поскольку известные хоминг-эндонуклеазы являются металл-зависимыми ферментами, было исследовано влияние катионов металлов на активность изучаемого фермента. Проверено влияние основных двухвалентных Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ и моновалентных катионов Na⁺ и K⁺ на активность эндонуклеазы SegD (рис. 2В, 2Г; рис. 3).

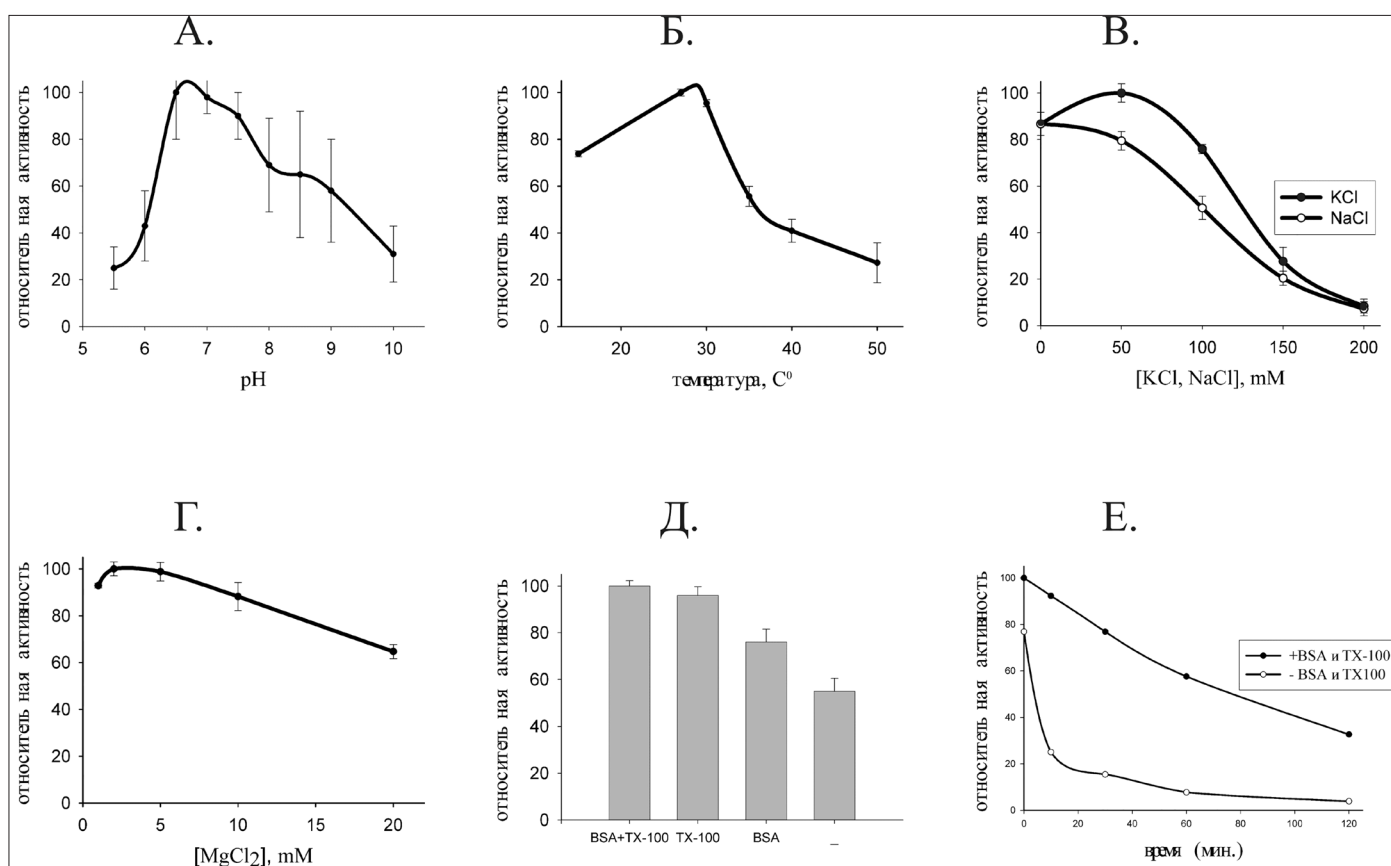


Рис. 2. Исследование биохимических свойств эндонуклеазы SegD. Влияние на активность эндонуклеазы SegD: pH (А), температуры (Б), моновалентных катионов Na⁺ и K⁺ (В), катионов Mg²⁺ (Г), влияние БСА и Тритона X-100 на эндонуклеазную активность SegD (Д), влияние БСА и Тритона X-100 на стабильность эндонуклеазы SegD (Е)

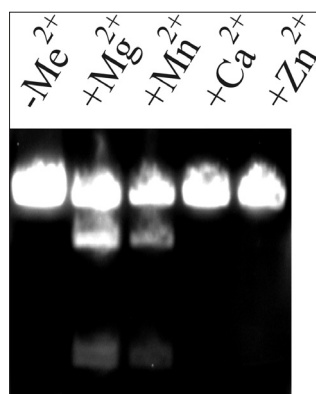


Рис. 3. Влияние двухвалентных катионов на активность эндонуклеазы SegD. Активность эндонуклеазы SegD в присутствии различных двухвалентных катионов. — Me²⁺-реакция в отсутствие двухвалентных катионов. Конечная концентрация катионов в реакционной смеси составила 10 мМ. В качестве субстрата использовалась линейризованная плаزمида ρUT2LsD, содержащая участок генома фага T2L с сайтом гидролиза SegD. При инкубации субстратной ДНК с эндонуклеазой SegD образуются два фрагмента размером 2,85 и 1,25 т.п.н. Суммарная длина образующихся фрагментов соответствует размеру исходной плазмиды

Было установлено, что при отсутствии в реакционной смеси двухвалентных металлов активность SegD не обнаруживается (рис. 3, проба 1). Данное обстоятельство указывает на абсолютную необходимость двухвалентных катионов для протекания ферментативной реакции. Однако присутствие моновалентных катионов Na⁺ и K⁺ в реакционной смеси не обязательно для проявления активности фермента и даже снижает его общую активность при концентрации выше 100 мМ (рис. 2В). Считается, что все ДНК-гидролизующие ферменты являются Mg-зависимыми ферментами, поэтому была исследована зависимость активности фермента от концентрации этого катиона (рис. 2Г). Наибольшая активность наблюдалась в присутствии 2 мМ ионов Mg²⁺. Как показано, добавление хелатирующего агента ЭДТА подавляет активность эндонуклеазы SegD. При замене Mg²⁺ на ионы других металлов, за исключением ионов Mn²⁺, фермент либо проявляет очень низкую активность, либо полностью неактивен. В присутствии только ионов Ca²⁺ активность эндонуклеазы SegD практически не детектировалась (рис. 3). Так же, как и в случае родственных эндонуклеаз SegE [3] и SegB [2], которые проявляли

активность в присутствии катионов Mn^{2+} , эндонуклеаза SegD также способна гидролизовать субстратную ДНК в присутствии данных катионов (рис. 3). Ионы Zn^{2+} в концентрации 10 мМ не способны активировать протекание реакции (рис. 3, проба 5).

Во время работы с SegD было отмечено, что фермент быстро теряет активность при разведении. Присутствие 0,1 мг/мл БСА в буфере для разведения стабилизирует фермент. Помимо БСА, к стабилизации фермента также приводит присутствие Тритона X-100 (рис. 2Д, 2Е).

Заключение

Таким образом, в настоящей работе нами разработана простая и эффективная схема получения сайт-специфической эндонуклеазы SegD бактериофага Т4. Получен препарат эндонуклеазы SegD и охарактеризованы некоторые биохимические особенности работы фермента. Очищенный препарат белка сохраняет активность при хранении в течение длительного промежутка времени. Высокая активность и специфичность эндонуклеазы SegD делают этот фермент удобным и перспективным объектом для создания на его основе инструментов для сайт-направленного введения разрывов в молекулы ДНК. Разработанная в выполненной работе схема выделения эндонуклеазы SegD закладывает фундамент для проведения дальнейших работ по изучению трехмерной структуры эндонуклеазы SegD и изучения механизмов ее взаимодействия с ДНК.

Интерес и активное изучение хоминг-эндонуклеаз связан с их уникальным свойством, способностью специфично узнавать протяженную (до 40 п.н.) последовательность ДНК. Это свойство в настоящий момент активно исследуется и используется для создания новых подходов к манипуляции с целыми геномами как *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, изучение хоминг-эндонуклеаз интересно с позиции понимания их роли в эволюции и функционировании целых геномов, в частности геномов бактериофагов и дрожжей.

Данная работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 10-04-01346-а.

Литература

1. Акуленко Н.В., Ивашина Т.В., Шалойко Л.А., Шляпников М.Г. и Ксензенко В.Н. Новые сайт-специфические эндонуклеазы F-TfII, F-TfIII и F-FfIV, кодируемые бак-

териофагом Т5 // Молекулярная биология. — 2004. — Т. 38. — № 4. — С. 632–641.

2. Брок-Волчанская В.С. Хоминг-эндонуклеаза SegB бактериофага Т4: биохимические свойства // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2007. — Т. 3. — С. 33–39.
3. Кадыров Ф., Калиман А. и Крюков В. Эндонуклеаза SegE фага Т4. I. Клонирование, экспрессия и биохимическая характеристика эндонуклеазной активности // Молекулярная биология. — 1996. — Т. 30. — С. 1096–1106.
4. Baker R., Catanzariti A., Karunasekara Y, Soboleva T., Sharwood R., Whitney S., Board P. Using deubiquitylating enzymes as research tools // Methods Enzymol. — 2005. — Vol. 398. — P. 540–554.
5. Belle A., Landthaler M. and Shub D.A. Intronless homing: site-specific endonuclease SegF of bacteriophage T4 mediates localized marker exclusion analogous to homing endonucleases of group I introns // Genes Dev. — 2002. — Vol. 16. — P. 351–362.
6. Brok-Volchanskaya V.S., Kadyrov F.A., Sivogriov D.E., Kolosov P.M., Sokolov A.S., Shlyapnikov M.G., Kryukov V.M. and Granovsky I.E. Phage T4 SegB protein is a homing endonuclease required for the preferred inheritance of T4 tRNA gene region occurring in co-infection with a related phage // Nucleic Acids Res. — 2008. — Vol. 36. — P. 2094–2105.
7. Dunin-Horkawicz S., Feder M., and Bujnicki J.M. Phylogenomic analysis of the GIY-YIG nuclease superfamily // BMC Genomics. — 2006. — Vol. 7. — P. 98. doi:10.1186/1471-2164-7-98.
8. Hafez M., Hausner G. Homing endonucleases: DNA scissors on a mission // Genome. — 2012. — Vol. 55. — P. 553–569.
9. Kadyrov F.A., Shlyapnikov M.G. and Kryukov V.M. A phage T4 site-specific endonuclease, SegE, is responsible for a non-reciprocal genetic exchange between T-even-related phages // FEBS Letters. — 1997. — Vol. 415. — P. 75–80.
10. Liu Q., Belle A., Shub D.A., Belfort M. and Edgell D.R. SegG endonuclease promotes marker exclusion and mediates co-conversion from a distant cleavage site // J. Mol. Biol. — 2003. — Vol. 334. — P. 13–23.
11. Roey P. and Derbyshire V. GIY-YIG Homing Endonucleases — Beads on a Sting / In: Belfort M., Stoddard B., Wood D., and Derbyshire V. (Eds.). Homing endonucleases and interins, 16. — Springer, Berlin, 2005. — P. 67–81.
12. Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. Ed. 2. — Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
13. Sharma M., Ellis R.L. and Hinton D.M. Identification of a family of bacteriophage T4 genes encoding proteins similar to those present in group I introns of fungi and phages // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1992. — Vol. 89. — P. 6658–6662.
14. Sitbon E. and Pietrokovski S. New types of conserved sequence domains in DNA-binding regions of homing endo-

- nucleases // Trends in Biochemical Sciences. – 2003. – Vol. 28. – P. 473–478.
15. Stoddard B.L. Homing endonuclease structure and function // Q. Rev. Biophys. – 2005. – Vol. 38. – P. 49–95.
16. Studier W., Rosenberg A., Dunn J. and Dubendorff J. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes // Methods Enzymol. – 1990. – Vol. 185. – P. 60–89.
17. Taylor G. and Stoddard B. Structural, functional and evolutionary relationships between homing endonucleases and proteins from their host organisms // Nucleic Acids Res. – 2012. – Vol. 40. – P. 5189–5200.
18. Van Roey P., Meehan L., Kowalski J.C., Belfort M., Derbyshire V. Catalytic domain structure and hypothesis for function of GIY-YIG intron endonuclease I-TevI // Nat. Struct. Biol. – 2002. – Vol. 11. – P. 806–811.
19. Yanisch-Perron C., Vieira J. and Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors // Gene. – 1985. – Vol. 33. – P. 103–119.

SITE SPECIFIC ENDONUCLEASE SegD OF BACTERIOPHAGE T4: BIOCHEMICAL PROPERTIES

A.S. SOKOLOV¹, I.E. GRANOVSKY²

¹ Institute for Biological Instrumentation RAS,

² G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino, Moscow Region

Bacteriophage T4 segD gene is located between 23 and 24 genes coding major capsid proteins. Based on the presence of conserved motifs, SegD belong to the GIY-YIG family homing endonucleases. In this paper we have developed a simple and effective scheme for preparation site-specific endonuclease SegD. In this work physicochemical properties of SegD were characterized and its endonuclease activity in different conditions was studied. The enzyme revealed the highest activity at pH 7.0–7.5, while the temperature optimum is 30 °C. Like other homing endonucleases, SegD is metal-dependent enzyme and its activity observed in presence of Mg²⁺ and Mn²⁺. The presence of the cations Na⁺ and K⁺ in the reaction mixture at a concentration above 50 mM decreases the activity of the enzyme.

Keywords: bacteriophage T4, site-specific endonuclease SegD, ubiquitin, cloning, biochemical properties.

ГЕНЕРАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛА БИОТОПЛИВНЫМ ЭЛЕМЕНТОМ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ВНУТРИПОЛОСТНОЙ ЖИДКОСТИ ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ *RANA TEMPORARIA* В КАЧЕСТВЕ ЭЛЕКТРОЛИТА

А.Н. РЕШЕТИЛОВ^{1*}, А.Е. КИТОВА¹, В.К. УТЕШЕВ², Т.А. РЕШЕТИЛОВА¹, Р.Г. ВАСИЛОВ³

¹ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН»,

²ФГБУН «Институт биофизики клетки РАН», Пущино;

³Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

Тенденция, характеризующая исследования последних лет в области биотопливных элементов, связана с их миниатюризацией и перспективой последующей имплантации в живой организм. В данной работе с этой целью впервые *in vitro* рассмотрен вариант использования внутриполостной жидкости травяной лягушки *Rana temporaria* в качестве электролита, входящего в биотопливный элемент как его составная часть и поддерживающего перенос заряда. Показана возможность функционирования микробных клеток в качестве биоматериала анода при использовании внутриполостной жидкости лягушки. Получены оценки генерируемого потенциала при окислении глюкозы; также показана возможность генерации потенциала при окислении этилового спирта. Рассмотрена возможность генерирования потенциала в экспериментах *in vivo*.

Ключевые слова: микробный биотопливный элемент, *Gluconobacter oxydans*, спектральный графит, *Rana temporaria*.

Введение

В последние десятилетия наблюдается заметное повышение интереса к изучению новых подходов по созданию биотопливных элементов (БТЭ) — систем, в основе функционирования которых лежит реакция биоэлектрокатализа [4]. Биоэлектрокатализ основан на межфазном переносе заряда [1], ускоряется при использовании биологического материала и позволяет производить электроэнергию при окислении органических соединений. Топливом для БТЭ могут служить различные органические соединения, в том числе сахара, спирты [2]. Особенностью БТЭ, отличающей их от общего класса батарей, аккумуляторов и других топливных элементов, является использование для окисления органических соединений биологического материала — ферментов, клеток, в том числе клеток микроорганизмов.

В разработках последних лет отмечена тенденция к созданию имплантируемых БТЭ. Предполагается, что для этой цели можно будет использовать как окисляемый субстрат или топливо присутствующую в живом организме глюкозу. Смысл данного подхода основан на том, что при функционировании БТЭ количество потребляемой глюкозы незначительно, что не приведет к ее существенной потере как метаболита для нужд живого организма. Первый БТЭ, имплантированный в брюшную полость крысы, был описан в 2010 г. [5].

Позднее в литературе появились результаты работ двух групп исследователей, в экспериментах которых были использованы различные виды беспозвоночных животных: тараканов [8], моллюсков [10], улиток [6], омаров [9]. Эти беспозвоночные обладают открытой системой циркуляции жидкости, играющей роль крови. В таких организмах эквивалент крови, так называемая гемолимфа не заключена в сосуды, а свободно перетекает по организму, снабжая его питательными веществами и кислородом. Открытая система позволяет сравнительно просто имплантировать компоненты биотопливной ячейки в организм, не вызывая повреждений у животного.

В нашей работе внимание было направлено на оценку возможности использования внутриполостной жидкости травяной лягушки *Rana temporaria* как основного электролита в БТЭ. Амфибии, как и все позвоночные, имеют замкнутую кровеносную систему. В то же время у большинства бесхвостых амфибий, в

© 2014 г. Решетиллов А.Н., Китова А.Е., Утешев В.К., Решетиллова Т.А., Васильев Р.Г.

* Автор для переписки:

Решетиллов Анатолий Николаевич

д.х.н., профессор, заведующий лабораторией биосенсоров

Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.

Скрыбина РАН,

142290 Московская обл., Пущино, Проспект Науки, 5,

Тел.: +7 (4967) 31-8600

E-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru

том числе у лягушек, на спинной и брюшной сторонах тела расположены обширные лимфатические пазухи, а внутриполостная жидкость по химическому составу близка к крови. Уровень глюкозы у травяной лягушки зависит от многих факторов, в том числе от времени года. Известно, что концентрация глюкозы в полостной жидкости лягушки может составлять от 4 (в норме) до 200 мМ у охлажденного животного [7], что теоретически является достаточным для генерации анодного потенциала и разности потенциалов в имплантированном БТЭ. Иммунная система травяной лягушки достаточно хорошо развита, что дает возможность в пробных экспериментах имплантировать БТЭ в ее брюшную полость или в брюшную лимфатическую пазуху с соблюдением минимальной стерильности. Вопрос в данном случае более всего акцентируется на конструкции БТЭ, в частности на создании миниатюрных электродов — анода и катода. Вышеперечисленные особенности травяной лягушки позволяют оценивать ее как перспективный объект для разработок новых типов БТЭ, предназначенных для имплантации. По имеющимся у авторов данным, до настоящего времени работ, посвященных оценке пригодности полостной жидкости лягушки для генерации биоэлектродокаталитического потенциала, не проводилось.

Целью настоящей работы являлось изучение генерации биоэлектродокаталитического потенциала при окислении субстратов в случае использования в качестве базового электролита внутриполостной жидкости травяной лягушки *Rana temporaria*. В качестве окисляемых субстратов тестировали глюкозу и этиловый спирт. Для формирования биоэлектрода (биоанода) использовали иммобилизованные бактериальные клетки *Glucobacter oxydans* ВКМ В-1280. Для оценки электрической активности системы применяли метод регистрации циклических вольтамперограмм и хронопотенциометрические измерения.

Материалы и методы

Схема измерения. Измерения проводили по трехэлектродной схеме. В качестве анода использовали электроды из спектрального графита (площадь рабочей поверхности электрода составляла $1,22 \text{ см}^2$) с иммобилизованными клетками *Glucobacter oxydans* ВКМ В-1280. Электродом сравнения являлся стандартный хлорсеребряный электрод; вспомогательным электродом служила платиновая пластина площадью $1,8 \text{ см}^2$. Хронопотенциометрические измерения про-

водили путем измерения стационарного потенциала рабочего электрода во времени относительно электрода сравнения. В качестве субстратов для биоанодов использовали глюкозу или этанол (ДиаЭм, Россия). Концентрации субстратов в рабочем электролите составляли 10–20 мМ. Для измерений использовали гальванопотенциостат (IPSMicro, «Кронас», РФ). Регистрацию ответов на добавку субстрата в измерительную ячейку начинали после установления стационарного состояния электродов, характеризующегося неизменным значением тока.

Измерения разности потенциалов в стандартных условиях в буферном растворе при перемешивании. Измерения проводили в 30 мМ калий-натрий фосфатном буферном растворе при перемешивании. Рабочий объем кюветы составлял 5 мл. Субстратами в контрольных измерениях являлись глюкоза, этиловый спирт с концентрациями в рабочем электролите 10 мМ. Изменение потенциала регистрировали при добавлении медиатора. В качестве редокс-медиатора использовали 2,6-дихлорофенолиндофенол (ДХФИФ, Sigma-Aldrich), 0,012 мМ.

Объект исследования. Исследование проводили с использованием травяной лягушки *Rana temporaria*. Спинализированную лягушку фиксировали на пенопластовой пластинке ($15 \times 10 \text{ см}$) вентральной (брюшной) стороной вверх. Небольшим надрезом вскрывали брюшную полость. Сбор внутриполостной жидкости осуществляли при помощи автоматической пипетки типа Эппендорф. Для проведения измерения разности потенциалов *in situ* в брюшную полость лягушки вводили измерительные электроды.

Измерения разности потенциалов в пробах. Рабочий объем кюветы составлял 1 мл. Измерения проводили без перемешивания в пробе внутриполостной жидкости лягушки при внесении медиатора, 0,06 мМ. В аналогичных контрольных измерениях вместо внутриполостной жидкости использовали буферный раствор, содержащий глюкозу или этиловый спирт в концентрации 20 мМ.

Измерения разности потенциалов *in situ*. Для измерения потенциала в животном в полость лягушки вносили 20 мкл 3 мМ ДХФИФ и через некоторое время глюкозу (50 мкл 1 М раствора).

Иммобилизация *G. oxydans* на аноде. В работе использовали штамм *G. oxydans* ВКМ В-1280, полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (ИБФМ РАН). Клетки *G. oxydans* иммобилизовали путем включения в гель

хитозана на поверхности электрода из спектрального графита. Для этого наносили на электрод 20 мкл биомассы (1 мг/мкл) на высоту 2 см, высушивали при комнатной температуре и затем наносили еще слой биомассы и еще раз высушивали. После чего наносили 20 мкл 2%-ного раствора хитозана в 1%-ной уксусной кислоте [11] и подсушивали при комнатной температуре. Выращивание бактерий проводили по методу, описанному в [3].

Результаты и обсуждение

1. Измерения стационарных потенциалов в стандартных условиях в буферном растворе при внесении окисляемых субстратов (глюкоза, этиловый спирт)

Были проведены предварительные эксперименты по измерению стационарных потенциалов в стандартных условиях в буферном растворе при перемешивании. На рисунке 1 представлены зависимости потенциала от времени, зарегистрированные для биоанода при добавлении в рабочий электролит этанола или глюкозы и медиатора.

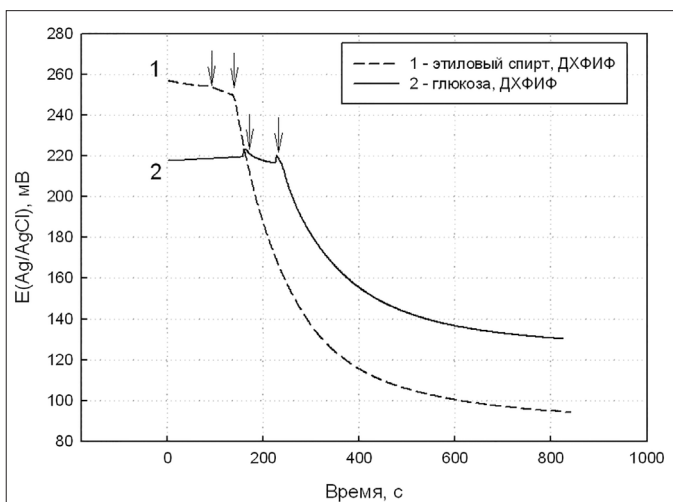


Рис. 1. Зависимости стационарных потенциалов от времени для биоанода при добавлении в электролит глюкозы или этанола и медиатора. Концентрация глюкозы и этилового спирта 10 мМ, ДХФИФ — 0,012 мМ

Видно, что при внесении медиатора в среду, содержащую глюкозу или этиловый спирт, стационарный потенциал биоанода возрастает и сдвигается в область отрицательных значений. Через 2000 с после добавления субстрата изменение потенциала рабочего электрода от исходного значения составляет величину порядка 100 мВ для этилового спирта и 90 мВ — для глюкозы.

2. Измерение стационарных потенциалов в пробах внутриполостной жидкости травяной лягушки (эксперименты in vitro)

Целью данной серии экспериментов являлось использование в качестве электролита внутриполостной жидкости травяной лягушки. Представленные в предыдущем разделе результаты рассматривались как контрольные и суть вопроса, затрагиваемого в этом разделе, состояла в ответе на вопрос, является ли внутриполостная жидкость травяной лягушки электролитом, позволяющим биокатализатору, в данном случае бактериальным клеткам *S. oxydans*, производить окисление субстратов — глюкозы и этилового спирта — и осуществлять перенос электронов на электрод (анод).

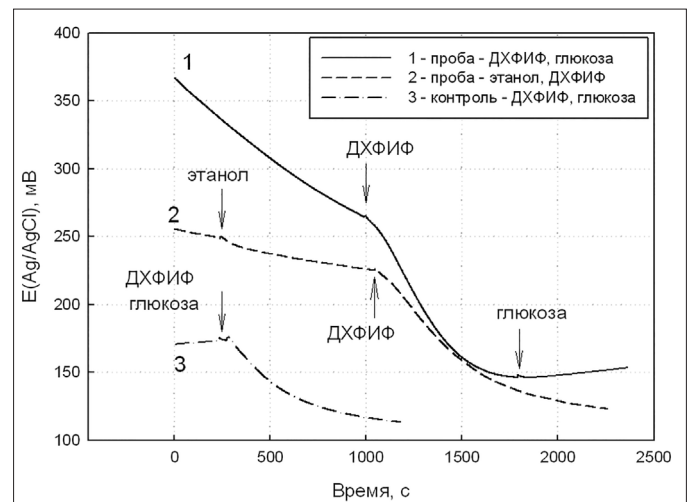


Рис. 2. Зависимости стационарных потенциалов от времени в пробе внутриполостной жидкости при добавлении ДХФИФ, глюкозы или этилового спирта (кривые 1, 2) и в буферном растворе при внесении ДХФИФ и глюкозы (кривая 3). Концентрация глюкозы и этилового спирта 20 мМ, ДХФИФ — 0,06 мМ

На рисунке 2 приведены результаты измерения разности потенциалов в образце внутриполостной жидкости травяной лягушки (эксперимент in vitro) при добавлении ДХФИФ и глюкозы (кривая 1) и этилового спирта и ДХФИФ (кривая 2), а также в контрольном буферном растворе при внесении ДХФИФ и глюкозы (кривая 3).

Результаты показали, что при внесении ДХФИФ в пробу глюкоза, содержащаяся в пробе внутриполостной жидкости травяной лягушки (кривая 1) или в буферном растворе (кривая 3), окисляется, что приводит к изменению разности потенциалов.

Стационарный потенциал в пробе внутриполостной жидкости травяной лягушки при внесении ДХФИФ

снижается на 113 мВ (кривая 1), при внесении этилового спирта и ДХФИФ снижается на 100 мВ. В контрольном измерении в буферном растворе при внесении ДХФИФ и глюкозы потенциал снижается на 65 мВ.

3. Измерения стационарных потенциалов в спинализованной лягушке

Как показали эксперименты *in vitro*, внутриполостная жидкость может быть использована в качестве электролита, что позволяет биокатализатору — бактериальным клеткам *G. oxydans* — производить окисление глюкозы и этилового спирта в присутствии медиатора и таким образом осуществлять перенос электронов на электрод (анод).

На рисунке 3 приведены результаты измерения разности потенциалов *in vivo*, полученные для спинализованного животного. Снижение стационарного потенциала до внесения ДХФИФ составило 36 мВ за 1000 с, после добавления ДХФИФ — 120 мВ за 1000 с.

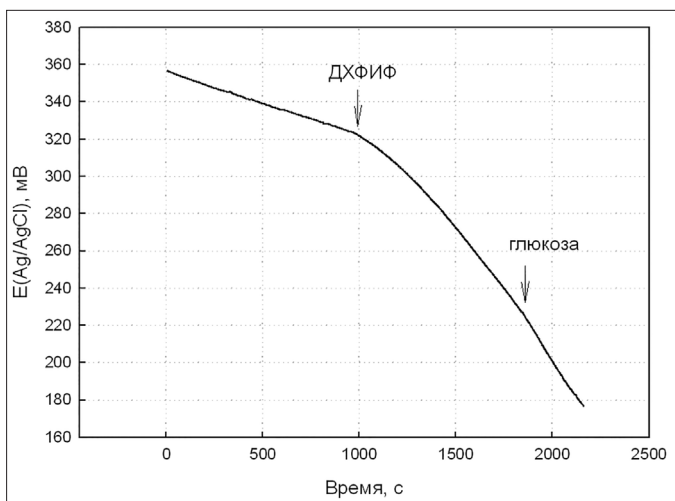


Рис. 3. Зависимость стационарного потенциала от времени при имплантировании в брюшную лимфатическую пазуху лягушки измерительных электродов. ДХФИФ — 20 мкл, 3 мМ, глюкоза — 50 мкл, 1 М

Как видно из приведенной кривой, при внесении ДХФИФ происходит резкое падение потенциала, а добавление глюкозы (50 мкл 1 М раствора) после внесения медиатора (20 мкл 3 мМ раствора) приводит к незначительному изменению потенциала. Эффект слабой реакции на добавленную глюкозу можно объяснить высоким уровнем исходной, собственной глюкозы, которая присутствует у животного. Описанный эксперимент не позволяет оценить этот уровень, можно лишь предположить, что он не ниже, чем добавленная концентрация (50 мкл 1 М раствора глюкозы).

Заключение

В работе проведена оценка возможности использования внутриполостной жидкости травяной лягушки *Rana temporaria* как основного электролита в БТЭ. Этот тип эксперимента выполнен впервые, в связи с чем получены ответы на ряд вопросов, которые можно сформулировать следующим образом. Во-первых, внутриполостная жидкость травяной лягушки *Rana temporaria* как электролит удовлетворяет условиям, необходимым для переноса заряда, и позволяет осуществлять реакцию биоэлектрокаталитической генерации потенциала; во-вторых, внутриполостная жидкость травяной лягушки *Rana temporaria* не содержит компонентов, ингибирующих активность биокатализатора, в данном случае бактериальных клеток *Glucobacter oxydans*; в-третьих, на основе генерации потенциала в присутствии медиатора можно заключить, что внутриполостная жидкость содержит достаточную для генерации концентрацию глюкозы и введение дополнительной порции глюкозы лишь незначительно ускоряет процесс генерации; в-четвертых, пробные эксперименты *in vivo*, проведенные с травяной лягушкой, показали, что для данного типа амфибий возможно имплантирование БТЭ и получение электрической энергии за счет окисления внутренних субстратов, в данном случае глюкозы. Проведенные тестовые эксперименты позволяют рассмотреть возможность дальнейших проб с имплантацией анода и катода БТЭ в организм травяной лягушки *Rana temporaria*.

Работа была поддержана грантом РФФИ 13-07-12052 (ОФИ_М_2013) «Исследование и создание нового класса источников питания для биосенсоров на основе биотопливного элемента, содержащего контроллер преобразования электрической энергии».

Литература

1. Варфоломеев С.Д., М.Р. Тарасевич, А.И. Ярополов, И.В. Березин, В.А. Богдановская. Государственный реестр открытий СССР, открытие N311, 19 декабря 1985 г.
2. Решетилов А.Н., Пономарева О.Н., Решетилова Т.А., Богдановская В.А. Генерация электрической энергии в биотопливном элементе на основе клеток микроорганизмов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2005. — Т. 1. — № 2. — С. 54–62.
3. Туркина М.В., Кошеченко К.А. Морфофизиологические особенности включенных в полиакриламидный гель

- клеток *Gluconobacter oxydans* // Известия Академии наук СССР. Серия биологическая. — 1986. — № 8. — С. 851–861.
4. Bullen R.A., Arnot T.C., Lakeman J.B., Walsh F.C. Biofuel cells and their development // Biosensors and Bioelectronics. — 2006. — Vol. 21. — No. 15. — P. 2015–2045.
 5. Cosnier S., Le Goff A., Holzinger M. Towards glucose biofuel cells implanted in human body for powering artificial organs: Review // Electrochemistry Communications. — 2013. DOI: 10.1016/j.elecom.2013.09.021.
 6. Halámková L., Halámek J., Bocharova V., Szczupak A., Alfonta L., Katz E. Implanted biofuel cell operating in a living snail // American Chemical Society. — 2012. — Vol. 134. — P. 5040–5043. dx.doi.org/10.1021/ja211714w
 7. MacDonald J.A., Degenhardt T., Baynes J.W., Storey K.B. Glycation of wood frog (*Rana sylvatica*) hemoglobin and blood proteins: In vivo and in vitro studies // Cryobiology. — 2009. — Vol. 59. — P. 223–225.
 8. Rasmussen M., Ritzmann R.E., Lee I., Pollack A.J., Scherson D. // J. Am. Chem. Soc. — 2012. — Vol. 134. — P. 1458–1464.
 9. Schröder U. From in vitro to in vivo-biofuel cells are maturing // Angewandte Chem. Int. Ed. — 2012. — Vol. 5. — P. 7370–7372.
 10. Szczupak A., Halamek J., Halamkova L., Bocharova V., Alfonta L., Katz E. Living battery – biofuel cells operating in vivo in clams // The Royal Society of Chemistry 2012. Energy Environ. Sci. DOI: 10.1039/c2ee21626d.
 11. Wang X., Gu H., Yin F., Tu Y. A glucose biosensor based on Prussian blue/chitosan hybrid film // Biosensors and Bioelectronics. — 2009. — Vol. 24. — No. 5. — P. 1527–1530.

GENERATION OF POTENTIAL BY BIOFUEL CELLS USING INTRACAVITARY FLUID GRASS FROG *RANA TEMPORARIA* AS AN ELECTROLYTE

A.N. RESHETILOV¹, A.E. KITOVA¹, V.K. UTESHEV², T.A. RESHETILOVA¹, R.G. VASILOV³

¹ G.K. Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS

² Institute of Cell Biophysics, RAS, Pushchino;

³ National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow

Recently miniature biofuel cells were developed for subsequent implantation into living organisms. In this paper, for the first time grass frog *Rana temporaria* intracavitary fluid was used in vitro as an electrolyte. *Rana temporaria* or its intracavitary fluid was an integral part of the biofuel element and supported the transfer of charge. The microbial cells of *Gluconobacter oxydans* were used as an anode biomaterial. We obtained the generated potential at the oxidation of glucose or ethanol. The possibility of potential generating in experiments in vivo is also shown.

Keywords: microbial biofuel cell, *Gluconobacter oxydans*, spectral graphite, *Rana temporaria*.

ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ НАНОРАЗМЕРНОЙ ТРАНСПОРТНОЙ ФОРМЫ РИФАБУТИНА

И.Г. КУЗНЕЦОВА^{1*}, С.Е. СЕВЕРИН¹, Г.Г. БАРСЕГЯН², Е.А. ЖУРЖА²

¹ ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России»,

² Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва

Полученные результаты экспериментальных исследований токсикологической оценки наноразмерного раствора рифабутин при однократном зондовом внутрижелудочном введении мышам линии Balb-C и крысам Уистар позволяют заключить, что отсутствуют половые различия по показателям острой токсичности, а также позволяют отнести рифабутин, включенный в нанотранспортную систему, к IV классу токсичности.

Ключевые слова: рифабутин, PLGA, токсичность, наночастицы.

Введение

Вопросы доставки лекарственных средств непосредственно в пораженные органы и ткани в настоящее время актуальны для фармацевтической индустрии. Особое внимание уделяется разработке путей и средств доставки известных лекарственных препаратов с помощью нанотранспортных систем, а также механизмам их взаимодействия с биологическими объектами [1]. Интерес к наноразмерным лекарственным средствам повышается, в том числе, и из-за частого отсутствия эффективного и безопасного патогенетического лечения традиционными лекарственными формами по причине их низкой биодоступности. Снижение концентрации лекарственного вещества в очаге патологии может быть вызвано его низкой растворимостью, частичным разрушением активного компонента, происходящим после попадания в организм и до того, как оно достигает цели. Также терапевтический потенциал многих широко применяемых антимикробных лекарственных средств значительно снижается из-за возникновения серьезной системной токсичности и иных нежелательных побочных эффектов, обусловленных низкой специфичностью действия.

При решении вопроса об увеличении степени безопасности и эффективности терапии современная

фармацевтическая технология стала рассматривать одно из перспективных достижений в области нанотехнологий — создание систем доставки лекарственных веществ на основе биodeградируемых, биосовместимых полимеров [8]. Такие системы доставки позволяют частично или полностью устранить недостатки существующих лекарственных форм: способность наночастиц преодолевать желудочно-кишечный барьер, сохраняя нативность иммобилизованных в них низкомолекулярных веществ, создает возможность введения многих препаратов перорально. Биодоступность может быть изменена за счет избирательной доставки лекарственного вещества в составе нанотранспортного средства к органу-мишени. При этом наблюдается увеличение концентрации наночастиц в очаге инфекции, поскольку, попадая в кровяное русло, наночастицы не выходят за пределы капилляров в здоровых тканях, так как размер частиц больше диаметра сосудистых стенок, что позволяет избежать преждевременной инактивации активного компонента в периферических тканях. Наночастицы циркулируют в кровеносном русле до момента достижения ими зоны воспаления, где просветы в стенках капилляров увеличиваются. Это связано с тем, что при воспалении есть необходимость выхода клеток иммунного ответа в зону воспалительного процесса для его ликвидации [13]. Поэтому в пораженные ткани вместе с клетками крови входит и нанотранспортное средство (рис. 1).

Таким образом, производится пассивная целевая доставка в необходимые области. Эта направленная доставка позволяет уменьшить токсичность и риск возникновения побочных и нежелательных реакций применяемых средств.

© 2014 г. Кузнецова И.Г., Северин С.Е., Барсегян Г.Г., Журжа Е.А.

* Автор для переписки:

Кузнецова Ирина Геннадьевна

старший преподаватель кафедры биологической химии

Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

E-mail: irina1105@rambler.ru

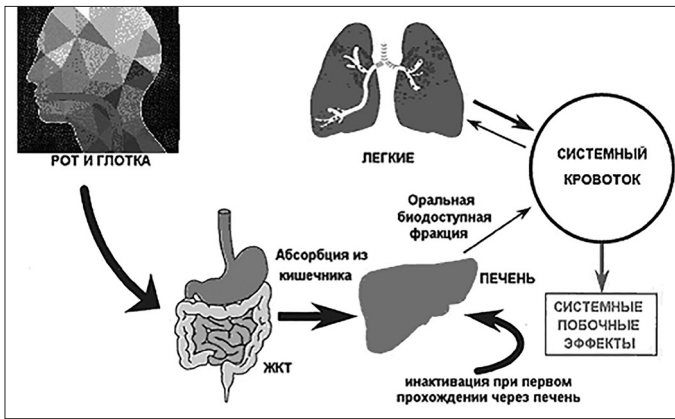


Рис. 1. Транспорт нанотранспортной системы лекарственного средства в орган-мишень (легкие)

Одним из лекарственных средств, для которого оправдано включение в нанотранспортную систему, является рифабутин. Рифабутин — антибиотик широкого спектра, ингибитор РНК-полимеразы, применяющийся в комбинированной терапии *Mycobacterium avium complex*, лечения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, комплексной терапии *Helicobacter pylori*. В низких концентрациях оказывает бактерицидное действие на *Brucella spp.*, *Chlamydia trachomatis*, *Legionella pneumophila*, *Rickettsia typhi*, *Mycobacterium leprae*. Характеризуется высокой активностью в отношении *Staphylococcus spp.* (в том числе пенициллиназообразующих и многих штаммов метициллиноустойчивых), *Streptococcus spp.*, *Clostridium sp.*, *Bacillus anthracis*; грамотрицательных кокков: менингококков, гонококков. Рифабутин нашел широкое применение в отношении внутриклеточно расположенных микроорганизмов [11].

Однако длительное применение рифабутина может вызывать нарушения функции печени и почек, аллергические реакции и диспепсические явления. Побочные эффекты рифабутина зависят от дозы и чаще всего наблюдаются при суточной дозе более 300 мг [9]. При приеме рифабутина в дозе 450 или 600 мг/сут. в комбинации с кларитромицином может развиваться иридоциклит (до 40% случаев). Иногда появляются полиартралгия и миалгия, исчезающие при отмене препарата. Возможны нейтропения, лейкопения, тромбоцитопения и повышение активности печеночных ферментов [15]. Риск развития увеита повышается при использовании крайне высоких доз (1050–2400 мг/сут.) (табл. 1) [14].

Поскольку побочные эффекты рифабутина имеют дозозависимый характер, то одним из путей снижения их возникновения является уменьшение доз препарата. Введение в организм лекарственной субстанции в наносомальной лекарственной форме позволяет добиться

необходимых концентраций лекарственного вещества непосредственно в органе-мишени, при этом исключая взаимодействие с нецелевыми биообъектами, что уменьшает нерациональный расход лекарственного средства (введение в организм завышенных доз). Фактором, который может сказываться на токсичности наночастиц, служит гидрофильность. Наночастицы рифабутина гидрофильны; это объясняется наличием гидроксильных групп PLGA, что, по данным научной литературы, может обуславливать показатель токсического эффекта [12].

Таблица 1

Типы нежелательных побочных реакций (НПР) (классификация ВОЗ)

Тип А — дозозависимые ПР, ≈ 75% всех НПР (>1:100), невысокая летальность	Фармакологические и токсикологические побочные эффекты — абсолютная и относительная передозировка
Тип В — дозозависимые, ≈ 25% всех НПР (<1:1000), высокая летальность	Иммунопатии, энзимопатии, НПР неизвестного генеза
Тип С — НПР вследствие длительной терапии	Толерантность, зависимость, синдром отмены, кумуляция, подавление выработки эндогенных веществ
Тип D — отсроченные эффекты	Мутагенность, канцерогенность, тератогенность

В силу малой изученности потенциальных рисков и побочных эффектов, сопряженных с использованием рифабутина в нанотранспортной лекарственной форме, существует необходимость оценки безопасности применения данного средства. Целью настоящего исследования явилась оценка острой токсичности созданной наносомальной лекарственной формы.

Материалы и методы

В качестве активной антибактериальной субстанции был выбран рифабутин (Taizhou Tianrui Chempharm Co., Ltd.). В работе также использовали следующие реактивы: сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA 50/50) фирмы Lactel, USA; полисорбат-80 фирмы Sigma-Aldrich, USA; D-маннит (>98%) фирмы Sigma-Aldrich, USA; диметилсульфоксид (ДМСО, 99,5%) фирмы Riedel-de Haën, ФРГ.

Полимерные наночастицы получали методом преципитации непосредственно перед употреблением препа-

рата, путем смешения концентрата с водным раствором до конечной концентрации ДМСО 5–10%.

Оценка токсичности полученного нанопрепарата осуществлялась согласно принятым в РФ правилам и методикам проведения экспериментов на лабораторных животных [4, 5, 7].

Острую токсичность определяли на мышах линии Balb/c и крысах Уистар обоего пола. Животных содержали в стандартных условиях вивария на полусинтетическом рационе, пищевая и биологическая ценность которого полностью удовлетворяли физиологические потребности. Доступ к пище и воде не ограничивали. Все животные до начала эксперимента находились в карантине не менее 14 суток. Исследования токсического действия каждой дозы проводили на 14 животных (7 самцов и 7 самок). Для изучения острой токсичности препараты вводили внутривенно с помощью шприца в боковую хвостовую вену, а перорально — через атравматический металлический зонд, постепенно погружая его до желудка. Большие дозы достигались путем дробного введения препаратов с интервалом 30÷60 минут между аппликациями. Оценивалось действие дозы, эквивалентной эффективной разовой терапевтической дозе лекарственной субстанции рифабутин для человека (300 мг), а также в 5 и 10 раз их превосходящих.

Наблюдения в первые сутки проводили непрерывно, в последующие дни 2 раза в день на протяжении 14 суток [3, 6].

Величину средней смертельной дозы (LD_{50}) препаратов рассчитывали по методу Литчфилда и

Уилкоксона. Статистическую обработку результатов проводили по методам Стьюдента и Манна — Уитни при $p=0,05$, а также методами непараметрической статистики [2].

Результаты и обсуждение

При изучении острой токсичности на грызунах при внутрижелудочном пути введения значения LD_{50} (по действующему веществу — рифабутин) составили:

- мыши 454 ± 23 мг/кг (самцы) и 454 ± 22 мг/кг (самки);
- крысы 366 ± 18 мг/кг (самцы) и 366 ± 16 мг/кг (самки);

При внутривенном пути введения значения LD_{50} (по действующему веществу — рифабутин):

- мыши $72 \pm 2,5$ мг/кг (самцы) и $72 \pm 2,5$ мг/кг (самки);
- крысы $70 \pm 1,7$ мг/кг (самцы) и $70 \pm 1,7$ мг/кг (самки), соответственно.

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии половых различий по показателям острой токсичности.

Результаты токсикометрии, данные наблюдений за экспериментальными животными на протяжении 14 дней после острого введения, а также данные некропсии позволяют отнести рифабутин, включенный в нанотранспортную систему, к IV классу токсичности (малоопасные вещества) [10].

Таблица 2

Степени токсичности (по Hodge и Sterner)

Степень токсичности	Термин	LD_{50} , однократно per os, крысы (мг/кг)	LD_{50} , однократно в/в*, крысы (мг/кг)
1	Чрезвычайно токсично	<1	<0,1
2	Высокотоксично	1–50	0,1–5
3	Умеренно токсично	50–500	5–50
4	Малотоксично	500–5000	50–500
5	Практически нетоксично	5000–15000	500–1500
6	Относительно безвредно	>15000	>1500

Примечание: * градации степеней токсичности при внутривенном пути введения определяются посредством умножения значений стандартных доз для оценки токсичности препарата при пероральном пути введения на коэффициент 0,1

Заключение

При решении вопроса о возможности применения лекарственного средства в медицинской практике основным является определение соотношения терапевтической ценности препарата и тех токсических эффектов, которые могут развиваться при его использовании. Данные эксперимента по определению острой токсичности, проведенному на мышах и крысах, показали, что при введении исследуемой формы животным препарат относится к малотоксичным (4 класс), LD_{50} находится в интервале 500–5000 мг/кг.

Литература

1. Васильев А.Е. Наноносители лекарственных веществ // Новая аптека. — 2003. — № 1. — С. 21–23.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. — М.: Практика, 1998. — 459 с.
3. Гуськова Т. Токсикология лекарственных средств. — М.: Русский врач, 2003. — 154 с.
4. Каркищенко Н.Н. Лабораторные животные: Положение и руководство. — М., 2003. — 138 с.
5. Приказ от 23.08.2010 г. № 708н Министерства здравоохранения и социального развития РФ «Правила лабораторной практики».
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. В.П. Фисенко. — М., 2000. — С. 18–24, 107–113, 349–356.
8. Elsabahy M., Wooley K.L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications // Chem. Soc. Rev. — 2012. — Vol. 41. — P. 2545–2561.
9. Finch C.K., Chrisman C.R., Baciewicz A.M., Self T.H. Rifampin and rifabutin drug interactions // Arch. Intern. Med. — 2002. — Vol. 162. — P. 985–992.
10. Hodge H. et al. Clinical Toxicology of Commercial Products / In: Acute Poisoning. Ed. IV. — Baltimore, 1975. — 427 p.
11. Kunin C.M. Antimicrobial activity of rifabutin // Clinical Infectious Diseases. — 1996. — Vol. 22(Suppl.). — S. 3–14.
12. Li X., Wang L., Fan Y., Feng Q., Cui F. Biocompatibility and toxicity of nanoparticles and nanotubes // Journal of Nanomaterials. — 2012. — P. 1–19. doi:10.1155/2012/548389.
13. Mohanraj V.J., Chen Y. Nanoparticles — a review // Tropical Journal of Pharmaceutical Research. — 2006. — Vol. 5(1). — P. 561–573.
14. Nichols C.W. Mycobacterium avium complex infection, rifabutin, and uveitis — is there a connection? // Clinical Infectious Diseases. — 1996. — 22(Suppl.). — S. 43–49.
15. Scampini G., Nava A., Newman A.J., Torre P.D., Maziúa G. Multinucleated hepatocytes induced by rifabutin in rats // Toxicol Pathol. — 1993. — Vol. 21(4). — P. 369–376.

A STUDY OF THE ACUTE TOXICITY OF RIFABUTIN NANOSIZED TRANSPORT FORM

I.G. KUZNETSOVA¹, S.E. SEVERIN¹, G.G. BARSEGYAN², E.A. ZHURZHA²

¹Sechenov First Moscow State Medical University,

²All-Russian Research Center of Molecular Diagnostics and Therapy, Moscow

The obtained experimental results of toxicological evaluation of nanosized rifabutin solution with a single probe intragastric administration to mice line Balb/c and Wistar rats suggest that there are no gender differences in terms of acute toxicity, as well as allow to include rifabutin nanotransport system to IV class toxicity.

Keywords: rifabutin, PLGA, toxicity, nanoparticles

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПРОЦЕССА ТЕРМИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ ИНУЛИНАЗ ИЗ *HELIANTHUS TUBEROSUS*

М.Г. ХОЛЯВКА*, Т.А. КОВАЛЕВА, Е.А. ХРУПИНА, В.Г. АРТЮХОВ, В.Н. КАЛАЕВ

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

Из клубней *Helianthus tuberosus* выделены и очищены до гомогенного состояния три фракции (I, II и III), проявляющие инулиназную активность. Установлено, что для всех фракций инулиназ доля инактивированных молекул существенно (минимум в 2 раза) превышает долю агрегировавших. Выдвинуто предположение, что процесс инактивации фермента под действием высоких температур (50–70 °С) идет быстрее по сравнению с процессом агрегации, а, следовательно, потеря каталитической способности энзима в малой степени коррелирует или совсем не связана с процессом образования белковых агрегатов. Продемонстрировано, что все три фракции инулиназы из *Helianthus tuberosus* обладают перспективной для промышленных процессов особенностью: устойчивы к действию высоких температур. Инулиназа I, образующая димеры, более термолабильна при 60 и 70 °С по сравнению с инулиназами II и III, которые встречаются в мономерной форме и приблизительно равноценны по исследуемому показателю. Выявленные нами молекулярная гетерогенность фракций растительных инулиназ, их различные температурные оптимумы функционирования и термоустойчивость расширяют горизонты их практического применения и повышают эффективность использования в качестве биокатализаторов в биореакторах.

Ключевые слова: инулиназа, температура, термическая инактивация, агрегация, денатурация.

Введение

Температура является одним из важнейших экологических факторов, от которого зависит протекание всех физиологических процессов, поддерживающих жизнедеятельность и обеспечивающих функционирование биосистем. Такой параметр, как термоустойчивость, — важнейший критерий отбора для ферментов промышленного значения; поэтому ниже мы представляем результаты исследования процесса термической инактивации фракций инулиназ из *Helianthus tuberosus*.

Применение инулиназы (КФ 3.2.1.7) для расщепления инулинсодержащего сырья позволяет получать в одностадийном процессе 95%-ный фруктозный сироп, который обладает низкой калорийностью и в настоящее время превратился в популярный заменитель сахара. Фруктозу, в отличие от глюкозы, могут потреблять больные диабетом, она значительно менее вредна для зубов, чем сахар.

Общеизвестно, что высокие температуры предотвращают риск заражения нежелательной микрофлорой фруктозных сиропов и растворов фруктоолигосахаридов, улучшают растворимость некоторых субстратов, включая инулин, и могут нивелировать цвет некоторых продуктов. Вместе с тем повышение температуры не только интенсифицирует скорость реакции образования фермент-субстратного комплекса, но и также может приводить к денатурации энзима и снижению его каталитической функции. К тому же для промышленного получения фруктозы из инулинсодержащего растительного сырья целесообразно использовать термотолерантные ферменты, потому что инулин обладает хорошей растворимостью только при температурах около 50 °С и выше.

Целью работы было выявление закономерностей процесса термической инактивации инулиназ, выделенных из клубней *Helianthus tuberosus*, что необходимо для расширения горизонтов их эффективного практического применения.

Материалы и методы

Объектами исследования были фракции белка, выделенные нами из клубней *Helianthus tuberosus*, проявляющие инулиназную активность. В качестве субстрата использовали инулин из цикория фирмы MP biomedical (порядка 5000 дальтон). Содержание белка определяли

© 2014 г. Холявка М.Г., Ковалева Т.А., Хрупина Е.А., Артюхов В.Г., Калаев В.Н.

* **Автор для переписки:**

Холявка Марина Геннадьевна
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Воронежский государственный университет
394006 Россия, Воронеж, Университетская площадь, 1
Тел.: +7 (473) 220-85-86
E-mail: holyavka@rambler.ru

методом Лоури, каталитическую активность фермента измеряли спектрофотометрически резординовым методом на фотоэлектроколориметре КФК-3 (Россия). За единицу каталитической активности инулиназы принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкМ фруктозы за 1 мин.

Для определения доли агрегировавших молекул ферментные образцы инкубировали при температурах 40, 50, 60, 70 и 80 °С в течение 10–60 мин., быстро охлаждали и центрифугировали 20 мин. при 25000 г на центрифуге Jouan MR23i (Франция). Далее измеряли оптическую плотность супернатанта при 280 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-2401PC (Япония). Образцы, не подвергавшиеся нагреванию, служили в качестве контроля. Долю агрегировавших молекул (γ_{agg}) определяли как $(1-D/D_0)$, где D_0 — оптическая плотность контрольных образцов, D — экспериментальных.

Для определения доли инактивированных молекул ферментные образцы также инкубировали при температурах 40, 50, 60, 70 и 80 °С в течение 10–60 мин., быстро охлаждали и центрифугировали 20 мин. при 25000 г на центрифуге Jouan MR23i (Франция). Далее к супернатанту добавляли раствор инулина и измеряли каталитическую активность препаратов инулиназы. Образцы, не подвергавшиеся нагреванию, служили в качестве контроля. Долю инактивированных молекул (γ_{in}) определяли как $(1-A/A_0)$, где A_0 — каталитическая активность контрольных образцов, A — экспериментальных.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при уровне значимости 5% с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Путем 4-стадийной очистки из клубней *Helianthus tuberosus* нами были получены три гомогенные фракции, обладающие инулиназной активностью, которые мы условно назвали инулиназа I, инулиназа II и инулиназа III: степень очистки и выход соответственно 55,7 и 5,4% (I), 28,9 и 3,1% (II), 21,6 и 1,9% (III). Ранее нами было обнаружено, что оптимумы функционирования фракций следующие: 48 °С, рН 6,8 — для инулиназы I, 39 °С, рН 6,2 — для инулиназы II и 44 °С, рН 4,5 — для инулиназы III [3]. Продемонстрировано, что инулиназа I образует димеры, а инулиназы II и III представлены мономерной формой [8].

Анализируя данные различных авторов, можно отметить, что для большинства инулиназ оптимум функ-

ционирования находится в диапазоне 45–55 °С, а для некоторых он соответствует 57 и даже 60 °С [2].

С целью изучения воздействия различных температур на конформацию молекул инулиназ из *Helianthus tuberosus* нами были проведены эксперименты по исследованию термостабильности данных препаратов. Для этого растворы белков инкубировали в интервале времени 10–60 мин. при различных температурах (40–80 °С) с последующим определением каталитической активности.

На рисунке 1 отражена динамика процесса термической инактивации инулиназ I, II и III из *Helianthus tuberosus*.

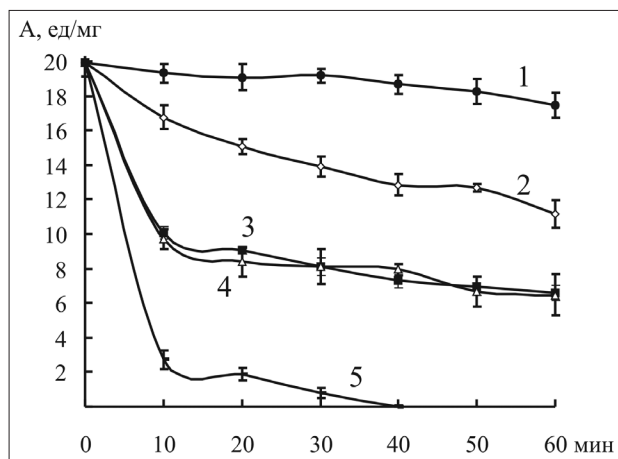
Инкубация инулиназы I при 50 °С не приводит к скачкообразным изменениям активности препарата, фермент инактивируется постепенно, сохраняя 56,1% каталитической способности при 60-минутном прогревании.

При 60 и 70 °С кривые зависимости активности инулиназы I от времени термической инактивации достоверно не отличаются друг от друга. Интересен тот факт, что при названных температурах резкая потеря ферментом каталитической способности происходит после 10-минутной инкубации: на 49,4 и 51,2%, соответственно. При дальнейшем увеличении времени инактивации наблюдается постепенное снижение активности, которое достигает 67 и 67,5%, соответственно, при 60-минутном прогревании образцов.

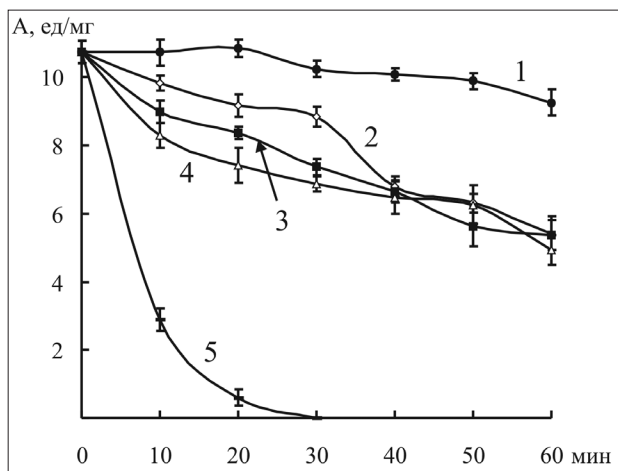
Таким образом, нами выявлено, что кривые термопревращения инулиназы I при 60 и 70 °С имеют два участка: первый (время инкубации менее 10 мин.) отличается высокой скоростью падения каталитической способности. Для второго (время инкубации от 20 до 60 мин.) характерна стабилизация остаточной активности фермента.

Наличие излома и двухфазный характер кривой термоинактивации инулиназы I, возможно, свидетельствуют о последовательном развитии как минимум двух стадий сложного процесса термомодификации белка и о наличии в системе двух форм фермента, характеризующихся различной устойчивостью к денатурирующему воздействию [4].

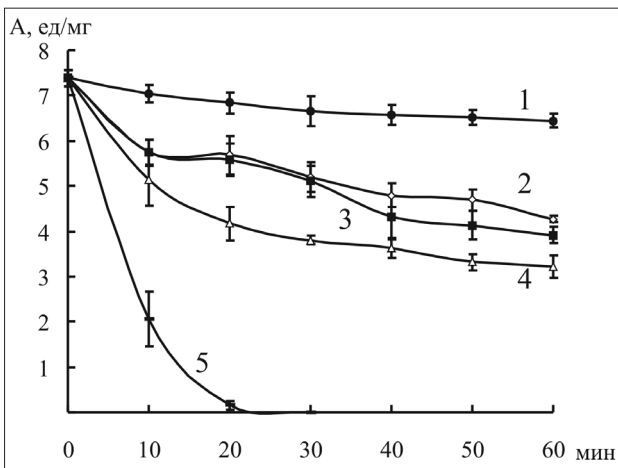
Форма кривых термической инактивации свободной инулиназы при температурах 60 и 70 °С указывает на возможность участия четвертичной структуры в регуляции каталитической активности за счет взаимодействия субъединиц. Изменение олигомерного состояния аллостерических ферментов при варьировании условий среды (рН, ионная сила, температура) является одним из механизмов регуляции активности ферментов в клетке.



А



Б



В

Рис. 1. Зависимость каталитической активности инулиназы I (А), II (Б) и III (В) от времени термической инактивации: 1 – 40; 2 – 50; 3 – 60; 4 – 70; 5 – 80 °С

Кривые зависимости активности инулиназы II от времени термической инактивации совпадают по форме при 50, 60 и 70 °С и заметным образом не отличаются друг от друга после 40-минутной инкубации. После 60-минутного прогрева образцы сохраняют 50,4, 50

и 45,8 % первоначальной каталитической способности, соответственно.

Для инулиназы III характерно практически полное совпадение кривых зависимости активности от времени термической инактивации при температурах 50 и 60 °С. При 70 °С происходит достоверно большая потеря каталитической способности. Процент сохранения активности для инулиназы III при 50, 60 и 70 °С после 60-минутной инкубации составляет соответственно 57,9, 53 и 43,6%.

Полученные нами результаты согласуются с данными ряда авторов. В.А. Абеяном и Л.С. Манукьяном (1996) показано, что инкубация инулиназы из *Kluveromyces marxianus* при температурах от 30 до 37 °С в физиологическом растворе в отсутствие субстрата не подавляла ее каталитической способности, однако при 45 °С терялось 25–30% ферментативной активности. Воздействие более высоких температур на фермент приводило к его резкой инактивации [1]. R.J. Rouwenhorst et al. (1990) установили, что время полужизни фермента составляет 30 мин. при 60 °С [9].

Анализируя не абсолютные значения активности инулиназ I, II и III, а процент ее сохранения по сравнению с нативными препаратами при инактивации в диапазоне температур 40–80 °С, мы получили довольно интересные результаты. Динамика потери каталитической способности при 40, 50 и 70 °С для всех трех ферментов сходна: кривые инактивации совпадают по форме при этих трех температурах и близки по значениям при 40 и 50 °С (рис. 2). При 60 °С наблюдается практически полное совпадение кривых инактивации для инулиназы II и III, у инулиназы I снижение каталитической способности происходит гораздо быстрее. При 80 °С мы также видим совпадение кривых инактивации для инулиназы II и III; инулиназа I в данных условиях инактивируется более интенсивно в интервале времени 0–10 мин., но еще проявляет каталитическую способность после 40-минутной инкубации, тогда как две другие инулиназы уже не обладают активностью после нагревания в течение 30 мин.

Примечательно, что при наибольшей каталитической активности нативного образца (19,9 ед./мг) и относительно высоком, по сравнению с инулиназами II и III температурном оптимуме (48 °С), инулиназа I является менее устойчивой при 60 и 70 °С, чем инулиназы II и III (табл. 1): константы скорости инактивации при названных температурах для инулиназы I выше, чем для инулиназ II и III и составляют 18,3 и 18,6 ч⁻¹, соответственно.

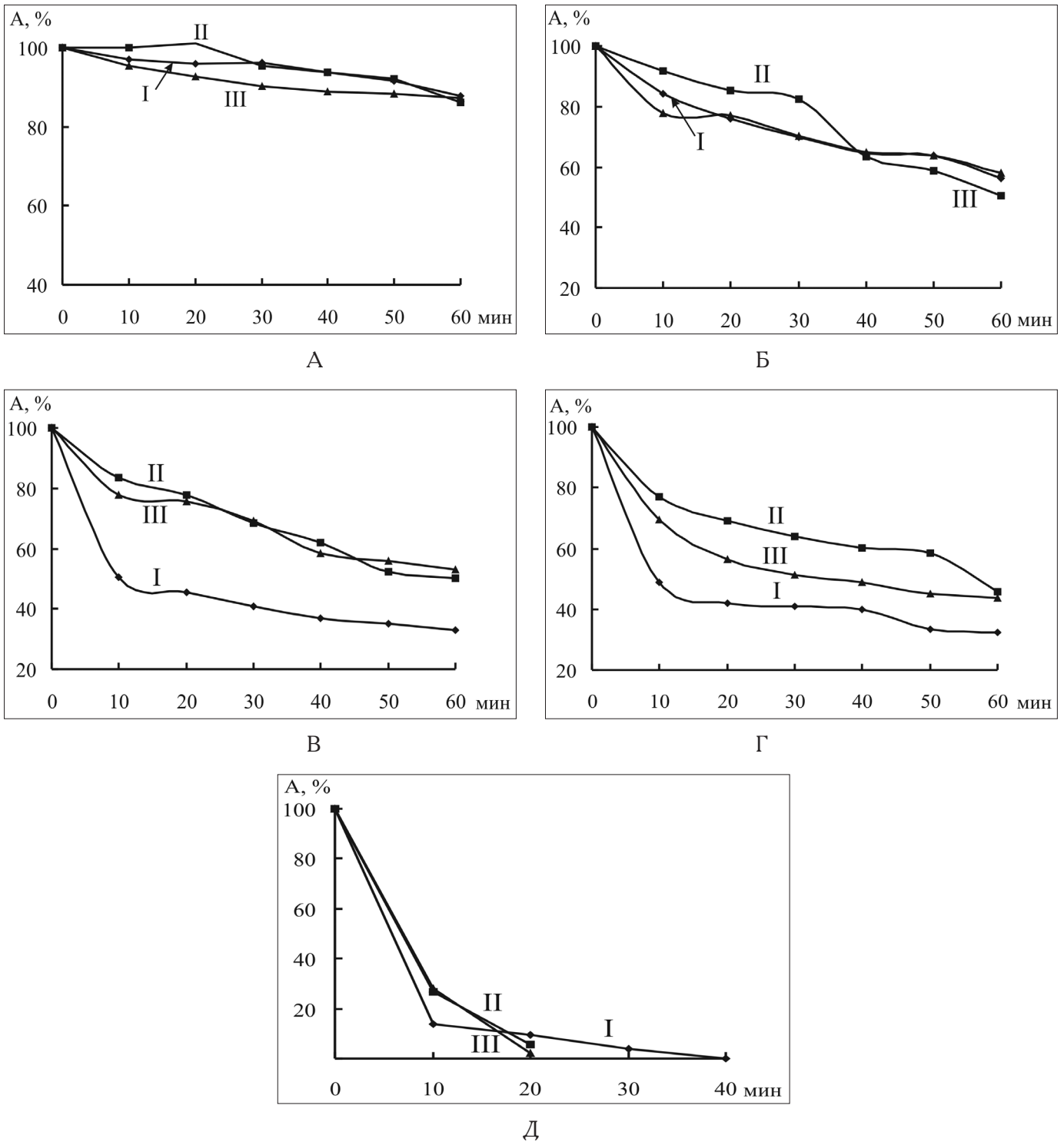


Рис. 2. Процент сохранения активности инулиназ I, II и III:
 А – при 40; Б – при 50; В – при 60; Г – при 70; Д – при 80 °С

Хотелось бы отметить, что Р.К. Gill et al. (2004, 2006) также выделили из *Aspergillus fumigatus* препараты инулиназы, отличающиеся по термической стабильности. Изоформа I проявляла 35,9 и 25,8% активности после 4-часовой инкубации при 50 и 55 °С,

соответственно, а изоформа II была более устойчива к температурным воздействиям и сохраняла 72 и 44% каталитической способности после 12-часовой инкубации при 60 и 70 °С. Оптимум функционирования обоих ферментов составлял 60 °С [5–7].

Таблица 1

**Константы скорости термической инактивации
инулиназ I, II и III из *Helianthus tuberosus***

Температура	k, ч ⁻¹ × 10 ⁻³		
	Инулиназа I	Инулиназа II	Инулиназа III
40 °C	2,2	2,5	2,3
50 °C	9,6	11,3	9,0
60 °C	18,3	11,5	10,5
70 °C	18,6	12,9	13,7
80 °C	107,3	96,7	128,8

В дополнение к экспериментам по термической инактивации инулиназ из *Helianthus tuberosus* мы определили долю молекул, агрегировавших под действием температур 40, 50, 60, 70 и 80 °C, и сравнили ее с долей инактивированных молекул (табл. 2).

Таблица 2

**Доля агрегировавших (γ_{agg}) и инактивированных (γ_{in}) молекул инулиназ I, II и III
из *Helianthus tuberosus***

Температура	Инулиназа I		Инулиназа II		Инулиназа III	
	γ_{agg}	γ_{in}	γ_{agg}	γ_{in}	γ_{agg}	γ_{in}
40 °C	0,01	0,12	0,02	0,14	0,04	0,13
50 °C	0,03	0,44	0,18	0,50	0,10	0,42
60 °C	0,05	0,67	0,23	0,50	0,12	0,47
70 °C	0,08	0,68	0,23	0,54	0,12	0,56
80 °C	0,40	0,96	0,43	0,95	0,52	0,98

Установлено, что для всех фракций инулиназ доля инактивированных молекул существенно (минимум в 2 раза) превышает долю агрегировавших. Поэтому логично предположить, что процесс инактивации фермента под действием высоких температур идет быстрее по сравнению с процессом агрегации, а, следовательно, потеря каталитической способности энзима в малой степени коррелирует или совсем не связана с процессом образования белковых агрегатов. В частности, для инулиназы I из *Helianthus tuberosus*, у которой наблюдается максимальная доля инактивированных молекул при 60 и 70 °C, по сравнению с другими растительными инулиназами, γ_{agg} имеют наименьшие значения. Для инулиназы II и III при одинаковых при 60 и 70 °C значениях γ_{agg} (0,23 и 0,12, соответственно) доля инактивированных молекул варьирует.

Заключение

Из всего вышеизложенного можно сделать вывод, что инулиназа I является более термолабильной по сравнению с инулиназами II и III, которые приблизительно равноценны по исследуемому показателю. Несмотря на это, все три фракции инулиназы из *Helianthus tuberosus* обладают перспективной для промышленных процессов особенностью: устойчивы к действию высоких температур и могут использоваться при создании новых технологических разработок, проектировании биореакторов и биокатализаторов. Молекулярная гетерогенность фракций растительных инулиназ, их различные температурные оптимумы функционирования и термоустойчивость расширяют горизонты их практического применения и повышают эффективность использования в качестве биокатализаторов в реакциях одноэтапного гидролиза инулина.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания вузам в сфере научной деятельности на 2014–2016 годы. Проект № 1035.

Литература

1. Абелян В.А., Манукян Л.С. Характеристика экзо-инулаз *Kluyveromyces marxianus* и *Bacillus licheniformis* // Биохимия. — 1996. — Т. 61. — № 6. — С. 1028–1036.
2. Артюхов В.Г., Холявка М.Г., Ковалева Т.А. Физико-химические и кинетические свойства инулиназ // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2013. — № 2. — С. 67–77.
3. Холявка М.Г., Ковалева Т.А., Хрупина Е.А., Артюхов В.Г., Калаев В.Н. Разработка методики выделения и очистки инулиназы из клубней *Helianthus tuberosus* и анализ ее физико-химических и кинетических свойств // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. — 2013. — № 9. — С. 43–52.
4. Artyukhov V.G., Kovaleva T.A., Kholyavka M.G., Bityutskaya L.A., Grechkina M.V. Thermal inactivation of free and immobilized inulinase // Applied Biochemistry and Microbiology. — 2010. — Vol. 46. — No. 4. — P. 385–389.
5. Gill P.K., Manhas R.K., Singh J., Singh P. Purification and characterization of an exoinulinase from *Aspergillus fumigatus* // Applied Biochemistry and Biotechnology. — 2004. — Vol. 117. — No. 1. — P. 19–32.
6. Gill P.K., Manhas R.K., Singh P. Comparative analysis of thermostability of extracellular inulinase activity from *Aspergillus fumigatus* with commercially available (Novozyme)

- inulinase // Bioresour. Technol. — 2006. — Vol. 97. — No. 2. — P. 355–358.
7. Gill P.K., Manhas R.K., Singh P. Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus* // Bioresource Technology. — 2006. — Vol. 97. — P. 894–902.
8. Holyavka M.G., Kovaleva T.A., Grechkina M.V., Ostankova I.V., Artyukhov V.G. Inulinases from various producers: The features of their permolecular organization // Applied Biochemistry and Microbiology. — 2014. — Vol. 50. — No. 1. — P. 10–16.
9. Rouwenhorst R.J., Hensing M., Verbakel J., Scheffers W.A., Dijken J.P. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 // Appl. Environ. Microbiol. — 1990. — Vol. 56. — No. 11. — P. 3337–3345.

LAWS OF PROCESS HEAT INACTIVATION OF INULINASE FROM HELIANTHUS TUBEROSUS

M.G. HOLYAVKA, T.A. KOVALEVA, E.A. HRUPINA, V.G. ARTYUKHOV, V.N. KALAEV

Voronezh State University, Voronezh

Helianthus tuberosus tuber isolated and purified to homogeneity three fractions (I, II and III), exhibiting inulinase activity. It was found that for all fractions share inulinase inactivated molecules is essential (at least 2 times) higher than the share aggregated. It is suggested that the process of enzyme inactivation at high temperatures (50–70 °C) is faster than with the process of aggregation, and, consequently, the loss of the catalytic ability of the enzyme to a small extent or not at all correlate associated with the formation of protein aggregates. Demonstrated that all three fractions inulinase from *Helianthus tuberosus* have a promising feature for industrial processes: resistant to high temperatures. Inulinase I, form a dimer, a thermolabile at 60 and 70 °C compared with inulinase II and III, which are found in the monomeric form and approximately equal in the studied parameters. We identified the molecular heterogeneity of plant fractions inulinase, their different temperature optima operation and thermal stability broadens the horizons of their practical application, and increase the efficiency of use as biocatalysts in bioreactors.

Keywords: inulinase, temperature, thermal inactivation, aggregation, denaturation.

УДК: 543.55 + 543.554

КОНВЕРТЕРНОЕ НАКОПЛЕНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ЭНЕРГИИ, ГЕНЕРИРУЕМОЙ БИОТОПЛИВНЫМ ЭЛЕМЕНТОМ МИКРОВАТТНОЙ МОЩНОСТИ

А.Н. РЕШЕТИЛОВ^{1*}, А.Е. КИТОВА¹, А.А. ИВАХНЕНКО¹, П.М. ГОТОВЦЕВ²,
Р.Г. ВАСИЛОВ², М.А. ГУТОРОВ³

¹ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина» РАН, Пушкино;

²Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва;

³ООО «ГАММА», Зеленоград

Микробный биотопливный элемент (БТЭ) использовали как первичный источник в системе сбора электрической энергии на основе конвертера BQ25504 (Texas Instruments). BQ25504 осуществляет трансформацию электрической энергии, получая ее от микроваттных первичных источников. Конвертер при стартовом напряжении на первичном источнике 0,33 В (обязательное условие) переходит в режим накопления энергии, для которого затем требуется поддерживающее входное рабочее напряжение 0,1 В. Разработанная система сбора на основе конвертера позволяла поднимать начальное напряжение БТЭ от 0,5 В до результирующего 3,1 В; накопленную энергию сохраняли на конденсаторах различной емкости. Данный подход рассматривается как начальная стадия исследования вопроса об использовании пары «БТЭ-конвертер».

Ключевые слова: биотопливный элемент, преобразователь напряжения, перспективы практического применения.

Введение

В последнее время повышенное внимание исследователей уделяется разработке аналитических (биосенсорных) и энергетических (биотопливных элементов) — систем на основе биоматериалов, в качестве которых могут выступать ферменты, клетки теплокровных организмов или микробные клетки. Как отмечалось в [1], биосенсоры и биотопливные элементы относятся к устройствам одного класса. В БТЭ происходит окисление органических соединений, что служит источником электрической энергии; биосенсоры определяют искомое соединение и при этом могут генерировать ток, если приложить к их электродам разность потенциалов, — в обоих случаях происходит прямое превращение химической энергии соединений в электрическую с участием биокатализаторов.

БТЭ могут использоваться для электрического питания устройств низкой мощности — эта точка зрения представлена в обзоре [1]. Под низкой подразумевается мощность, заключенная в диапазоне от 10^{-7} до 10^{-3} Вт, снимаемая с одного квадратного сантиметра площади электрода. В этой связи можно отметить, что существует задача повышения мощности БТЭ для их более широкого использования. Такие источники могут найти применение не только как источники питания для плееров, мобильных телефонов, планшетных компьютеров, но главным образом они могут быть использованы в медицине как источники электрической энергии для микроустройств типа водителей сердечного ритма, микронасосов и тому подобного оборудования. Причем задача их использования не подразумевает обязательным режим постоянного отбора электроэнергии от них — вполне приемлемым является периодическое включение «по надобности», например, для подачи лекарств микронасосом.

Задача повышения мощности может быть решена различными методами. Так, последовательное и параллельное соединение БТЭ использовали в работе [3]. БТЭ были сформированы на основе живых организмов — двустворчатых моллюсков. Напряжение холостого хода, ток короткозамкнутой цепи, максимальная мощность составляли соответственно 800 мВ, 25 мА, 5,2 мВт и 360 мВ, 300 мА, 37 мВт для последовательного и параллельного включения трех БТЭ. Набор БТЭ был

© 2014 г. Решетиллов А.Н., Китова А.Е., Ивахненко А.А.,
Готовцев П.М., Васильев Р.Г., Гуторов М.А.

* **Автор для переписки:**

Решетиллов Анатолий Николаевич
д.х.н., профессор, заведующий лабораторией биосенсоров
Института биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрабина РАН,
142290 Московская обл., Пушкино, Проспект Науки, 5,
Тел.: +7 (4967) 31-8600
E-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru

соединен с накопительным конденсатором (ионистором) емкостью 1 Ф, который заряжался от БТЭ за время порядка 60 мин. до 240 мВ при накопленной энергии ~29 мДж. Накопленной энергии было достаточно, чтобы повернуть на угол 90° ротор электродвигателя, имеющего входное сопротивление 6,5 Ом.

Другой пример применения БТЭ относится к области использования их как источники питания биосенсоров. Так, в работе [4] представлен биотопливный элемент, встроенный в контактную линзу человека и генерирующий энергию за счет использования глюкозы, находящейся в слезной жидкости человека, практически не меняя при этом ее содержания в организме. БТЭ генерировал напряжение холостого хода в 0,57 В при развиваемой мощности 1 мкВт/см². Авторы считают, что использование диагностического прибора на основе контактной линзы и содержащего глюкозный биосенсор было бы весьма полезно для больных с нарушенным обменом глюкозы. Этот пример также может относиться к режиму периодического использования малоомощных БТЭ. В целом можно сделать заключение, что источники питания на основе БТЭ могли бы найти широкое применение как в немодифицированном виде, так и в случае, когда внешние дополнительные устройства смогли бы быть использованы для накопления генерируемой ими энергии.

Исходя из того факта, что БТЭ является практически полезным устройством, ценность которого заметно возросла бы при наличии методики накопления его электрической энергии, в данной работе рассмотрен новый подход к решению вопроса накопления энергии. Фирма Texas Instruments выпустила в продажу повышающий конвертер напряжения, предназначенный для работы с микро- и милливаттными источниками энергии, генерируемой фотогальваническими, термоэлектрическими, электромагнитными и вибрационными преобразователями. Конвертер основан на микросхеме bq25504. Конвертер может трансформировать извлеченную энергию и передавать ее на накопительные элементы различных типов, включая Li-ионные аккумуляторы, ионисторы.

Цель данного исследования состояла в оценке возможности применения конвертера напряжения bq25504 в сочетании с биотопливным элементом для сбора энергии. На первом этапе исследования рассмотрели режим накопления, при котором исходное напряжение БТЭ, равное 300–350 мВ, конвертером поднимается до уровня 3,1 В и сохраняется на конденсаторах различной емкости. В качестве источника электроэнергии исполь-

зовали микробный биотопливный элемент, обладающий микроваттной выходной мощностью.

Материалы и методы

В работе использовали штамм *Gluconobacter oxydans* ВКМ В-1280 (Всероссийская коллекция микроорганизмов). Измерительная ячейка представляла собой два последовательно включенных БТЭ с напряжением холостого хода для каждого ~250 мВ. При последовательном включении напряжение суммировалось и составляло ~500 мВ. Объем анодного отделения был равен объему катодного и составлял 5 мл. В качестве электродов анода и катода использовали стержни спектрального графита диаметром 6 мм, которые погружали в раствор на глубину 15 мм. Электролитическая связь анодной и катодной кювет одиночного БТЭ осуществлялась через отверстие в стенках анода и катода, закрытое протон-проницаемой мембраной МФ-4СК («Пластполимер», Санкт-Петербург, Россия) площадью 0,3 или 1,2 см². Базовым раствором являлся 25 мМ калий-натрий фосфатный буфер, рН 6,0, с добавлением 50 мМ хлорида натрия. В качестве медиаторов использовали 2,6-дихлорофенолиндофенол (ДХФИФ) для анодного отделения и гексацианоферрат(III) калия (ГЦФ) для катодного (Sigma-Aldrich, Co). Субстратами для окисления клетками *G. oxydans* являлись глюкоза и этиловый спирт. Во внешнюю цепь включали гальванопотенциостат (Ametek, Inc., США). Регистрацию циклических вольтамперных характеристик (ЦВА) проводили при скорости развертки 3 мВ/с. Раствор буфера перемешивали магнитной мешалкой. Режим накопления рассматривали для двух БТЭ, включенных последовательно.

Иммобилизацию микроорганизмов осуществляли путем включения их в гель хитозана, нанесенный на поверхность электрода. Для этого наносили на электрод биомассу (1 мг/мкл). Высота, занимаемая микробными клетками на электроде, составляла 2 см. Электрод высушивали при комнатной температуре. После чего поверхность клеток наносили 20 мкл 2%-ного раствора хитозана в 1%-ной уксусной кислоте [2] и подсушивали при комнатной температуре.

Комплекс конвертирования был представлен отладочным устройством bq25504, к которому подключали источник энергии в виде микробного БТЭ, и измерительным устройством, сопряженным с персональным компьютером (ПК), оснащенным программой для регистрации данных (рис. 1). 4-канальное измерительное устройство и программа для ПК были разработаны

авторами исследования. Измерительное устройство имело высокое входное сопротивление для того, чтобы исключить шунтирующее влияние на режим накопления конвертером. Режим накопления энергии апробировали на конденсаторах емкостью 100 и 1000 мкФ (фирма SamYoung), а также ионисторе емкостью 1 Ф (фирма Panasonic).

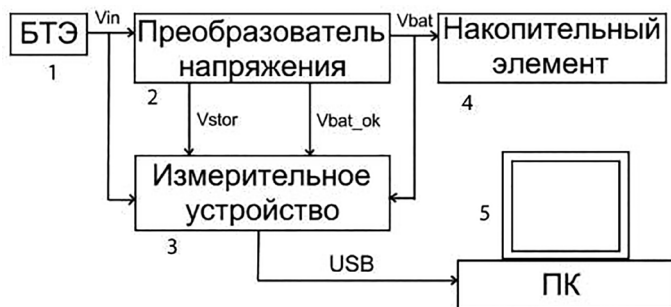


Рис. 1. Блок-схема комплекса для конвертирования электрической энергии, вырабатываемой микробным БТЭ. 1 – БТЭ, 2 – конвертер bq25504, 3 – измерительное устройство, 4 – накопительный элемент, 5 – компьютер

Микросхема bq25504 является первым, поступившим на рынок прибором для сбора электрической энергии микроваттной мощности, ее сохранения и передачи в накопители — аккумуляторы, ионисторы, конденсаторы. bq25504 также реализует функции защиты накопителя, так что аккумуляторная батарея или конденсатор могут быть использованы в качестве элементов хранения энергии без опасности разряда через конвертер. Конструкция bq25504 состоит из повышающего преобразователя DC-DC (постоянный ток-постоянный ток), зарядного устройства, которому необходим входной поток микроваттной мощности, чтобы обеспечить стартовые условия работы. Повышающий преобразователь может быть запущен при напряжении 330 мВ и после старта позволяет собирать энергию от источника при напряжении порядка 100 мВ, обеспечивая повышение напряжения до 3,1 В (обеспечивается настройкой микросхемы).

Результаты и обсуждение

План исследования. План исследования был построен так, чтобы оценить возможность применять микросхему bq25504 в качестве конвертера для накопления энергии и ее сохранения на конденсаторах различной емкости при использовании микробного биотопливного элемента, обладающего микроваттной выходной электрической мощностью.

На первом этапе была выполнена проверка функционирования комплекса на источнике химической энергии (батарея АА, «Космос»), затем на фотоэлементе как генераторе напряжения, затем на микробном БТЭ. Были рассмотрены режимы накопления на конденсаторах различной емкости.

Работа компьютерной программы. Программа написана на языке программирования Delphi 7. Измерительный модуль подключен к ПК через USB-порт, связь с программой осуществляется по COM-порту. Это достигнуто с помощью установки на ПК драйвера, создающего виртуальный COM-порт. Передача данных осуществляется как по RS-232 интерфейсу для облегчения разработки измерительной системы.

Программа представляет собой оконное приложение, на котором имеются элементы управления и индикация данных. Внешний вид главного окна программы представлен на рисунке 2.

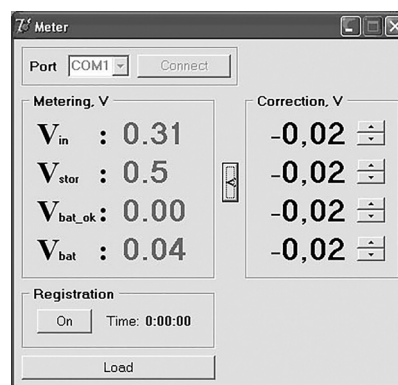


Рис. 2. Внешний вид индикаторного окна программы

Для начала работы выбирается COM-порт, к которому подключен измерительный модуль, затем нажимается кнопка [Connect] (Начало). При этом в поле [Metering] (Измерение) отображаются значения напряжений по 4 каналам, что показано на рисунке 2. Данные обновляются каждые 3 сек. Становятся доступными кнопки [On] (Включение) в поле [Registration] (Регистрация) и [Load] (Нагрузка). При нажатии кнопки [On] начинается отсчет времени и происходит регистрация данных. При повторном нажатии на эту кнопку регистрация данных прекращается и все данные автоматически копируются в буфер обмена. Эти данные можно вставить, например, в приложение Excel для обработки и построения графиков. При нажатии кнопки [Load] происходит переключение емкостного накопительного элемента от преобразователя напряжения к любой подключенной нагрузке. При повторном нажатии происходит обратное переключение. Кнопка [>] позво-

ляет открыть дополнительное поле «Correction» (Коррекция), позволяющее сделать поправку в установлении погрешности измерения.

Конвертирование энергии модельных источников. Химический элемент «Космос». Процесс накопления электроэнергии на емкости 1 Ф (использован ионистор) представлен на рисунке 3.

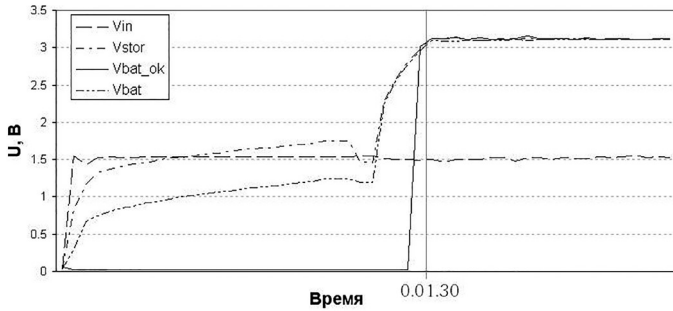


Рис. 3. Диаграмма напряжений V_{in} , V_{stor} , V_{bat_ok} и V_{bat} (пояснения в тексте).

Обозначения для рисунка 3 и далее:

- V_{in} — входное напряжение;
- V_{stor} — напряжение заряда (напряжение, которое производит преобразователь для заряда накопительного элемента);
- V_{bat} — напряжение на накопительном элементе (к нему подключается накопительный элемент);
- V_{bat_ok} — напряжение, сигнализирующее о достижении установленного уровня напряжения заряда.
- Горизонтальная ось — T , время работы устройства, час:мин:сек

Из диаграммы видно, что входное напряжение для конвертера в течение всего эксперимента сохранялось постоянным, что создавало благоприятные условия конвертирования. Напряжение на конденсаторе достигает значения 3,1 В за 1,5 мин. и хранится на внешнем конденсаторе без изменения в течение 1 мин.

Фотоэлемент. Результаты эксперимента с фотоэлектрическим элементом приведены на рисунке 4. В данном случае фотоэлемент использовали как источник с изменяющимся в зависимости от освещения выходным напряжением. На диаграмме виден неравномерный, обусловленный различным уровнем освещенности, уровень напряжения источника (V_{in}) и, как отражение этого, неравномерный рост заряда на конденсаторе в 1000 мкФ. Тем не менее через ~3 мин. заряд достиг уровня 3,1 В, после чего устройство было выключено.

Конвертерное накопление энергии БТЭ. Для повышения выходного напряжения использовали два БТЭ, включенные последовательно. БТЭ имели следу-

ющие параметры. Зависимость силы тока от напряжения (ЦВА) для одиночного и двух БТЭ, включенных последовательно, показаны на рисунке 5. Видно, что последовательное включение позволяет суммировать напряжение источников, что обеспечивает условие стартового напряжения конвертера $U_{start} \geq 330$ мВ.

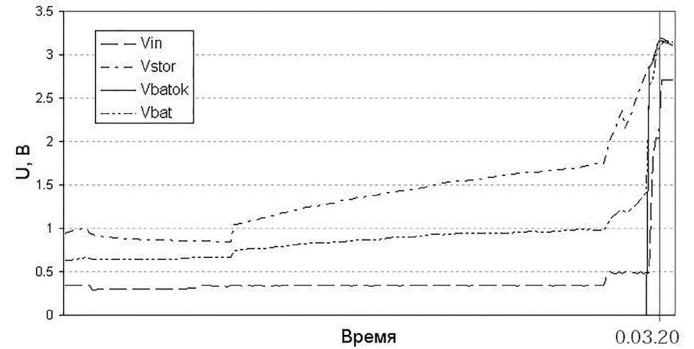


Рис. 4. Диаграмма напряжений V_{in} , V_{stor} , V_{batok} и V_{bat} (эксперимент с фотоэлектрическим элементом)

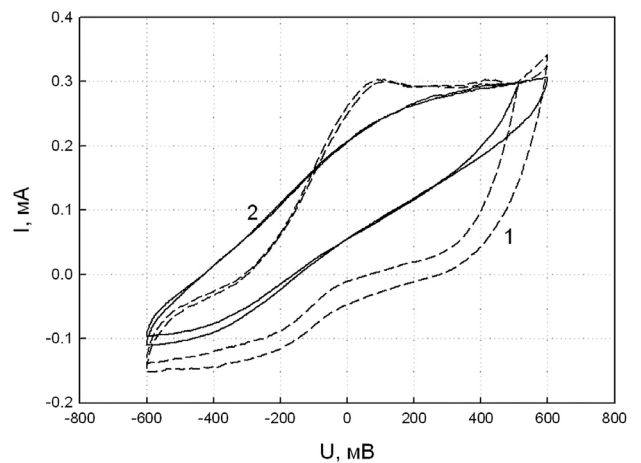


Рис. 5. ЦВА при измерениях для одиночного БТЭ (1) и для двух последовательно подключенных БТЭ (2)

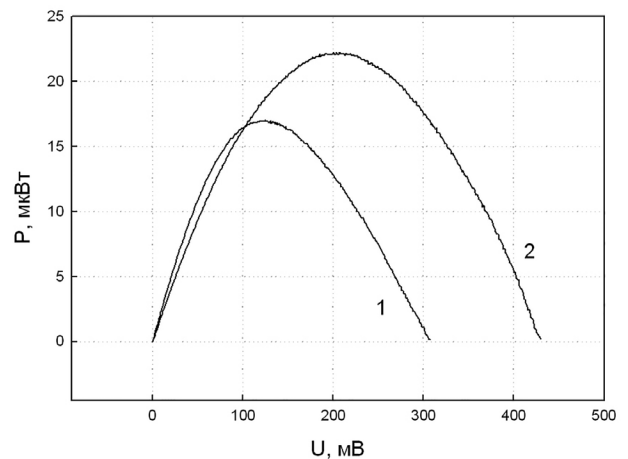


Рис. 6. Мощность БТЭ: 1 — одиночный БТЭ, 2 — два последовательно подключенных БТЭ

Мощностные характеристики для одиночного и последовательно включенных БТЭ приведены на рисунке 6. Последовательное включение приводит к росту мощности, обусловленному ростом генерируемого напряжения.

Исследования режима работы системы «БТЭ — преобразователь напряжения — конденсатор». В первом эксперименте в качестве накопительного элемента был использован конденсатор емкостью 1000 мкФ. Результат эксперимента приведен на рисунке 7.

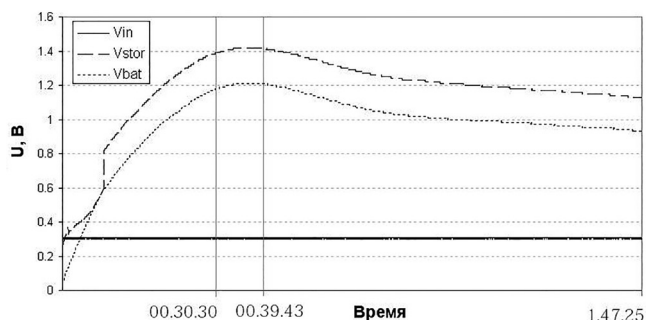


Рис. 7. Накопление энергии на конденсаторе емкостью 1000 мкФ

На рисунке 7 видно, что напряжение на конденсаторе через 30,5 мин. установилось на уровне 1,2 В и не увеличивалось более; время удержания составляло ~9 мин. «Недозарядку» емкости можно объяснить параметрами БТЭ — площадь ионообменной мембраны первоначально составляла 0,3 см² и была недостаточна, чтобы обеспечить соответствующий конвертеру поток выходной энергии (что также объяснимо на уровне внутреннего сопротивления БТЭ, которое составляло ~ 3700 Ом). Высокое внутреннее сопротивление было также обусловлено достаточно низкой ионной силой исходного буферного раствора (25 мМ). В дальнейшем увеличение ионной силы буферного раствора за счет добавления хлорида натрия (50 мМ) и увеличение площади ионообменной мембраны (до 1,2 см²) позволили снизить внутреннее сопротивление до 900 Ом.

Во втором эксперименте в качестве накопительного элемента был использован конденсатор емкостью 100 мкФ. Результат эксперимента представлен на рисунке 8.

Виден рост напряжения на выходе конвертера V_{stor} и V_{bat} на конденсаторе. Конденсатор в 100 мкФ за время порядка 13 мин. заряжался до значения 3,1 В. Снижение емкости конденсатора по сравнению с экспериментом, приведенным на рисунке 7, позволило поднять напряжение на накопителе до требуемой величины 3,1 В. При этом время хранения заряда составляло ~5 часов.

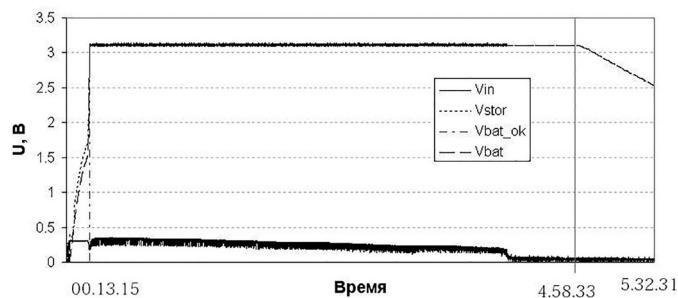


Рис. 8. Накопление электрической энергии на емкости 100 мкФ

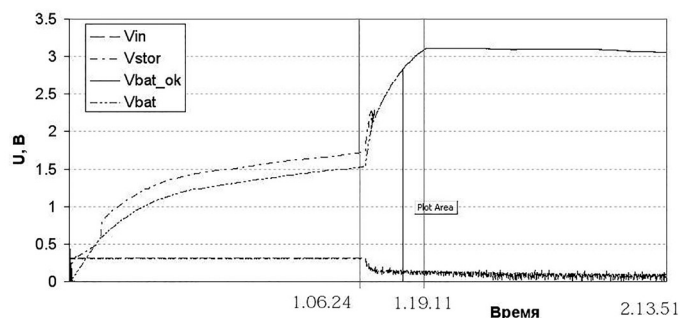


Рис. 9. Накопление энергии на конденсаторе 1000 мкФ при использовании двух последовательно подключенных БТЭ

Результат накопления энергии на конденсаторе 1000 мкФ при использовании двух БТЭ, у которых площадь ионообменной мембраны была повышена и составляла 1,2 см², отображен на рисунке 9. Кроме увеличенного размера ионообменного окна, приводящего к снижению внутреннего сопротивления БТЭ, в этом эксперименте были произведены изменения — увеличена концентрация медиатора и топлива — была применена смесь глюкозы и этилового спирта, окисляемая более интенсивно. В момент существенного замедления роста заряда конденсатора, примерно через 1 час, в БТЭ было добавлено 200 мкл ДХФИФ в концентрации 1 мг/мл и 200 мкл смеси глюкозы и этилового спирта (1 М). Это дало существенный прирост мощности БТЭ и, как следствие, резкий рост заряда конденсатора и быстрое достижение значения $V_{bat} = 3,1$ В. Из диаграммы видно, что заряд конденсатора на уровне 3,0–3,1 В сохранялся в течение ~60 мин.

Заключение

В заключение можно отметить следующее. Показана работоспособность структуры «БТЭ-конвертер-конденсатор». Процесс накопления зависит от емкости конечного приемника и при недостаточной мощности

БТЭ накопленное напряжение может не достигать установленного значения. В дальнейшие планы исследования входят оценка и повышение КПД системы, повышение удельной мощности и стабильности работы БТЭ во времени, которые позволят перейти к проектированию практически значимых устройств.

Литература

1. Bullen R.A., Arnot T.C., Lakeman J.B., Walsh F.C. Biofuel cells and their development // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2006. – Vol. 21. – No. 15. – P. 2015–2045.
2. Falk M., Andoralov V., Blum Z., Sotres J., Suyatin D.B., Ruzgas T., Arnebrant T., Shleev S. Biofuel cell as a power source for electronic contact lenses // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2012. – Vol. 37. – P. 38–45.
3. Odaci D., Timur S., Telefoncu A. Bacterial sensors based on chitosan matrices // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2008. – Vol. 134. – No. 1. – P. 89–94.
4. Szczupak A., Halamek J., Halamkova L., Bocharova V., Alfonta L. and Katz E. Living battery – biofuel cells operating in vivo in clams // *The Royal Society of Chemistry. Energy Environ. Sci.* – 2012. DOI: 10.1039/c2ee23209j.

CONVERTER ACCUMULATION OF ELECTRICAL ENERGY GENERATED BY BIOFUEL CELLS MICROWATT POWER

A.N. RESHETILOV¹, A.E. KITOVA¹, A.A. IVAHNENKO¹, P.M. GOTOVTSEV², R.G. VASILOV², M.A. GUTOROV³

¹ G.K. Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino;

² National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow;

³ Gamma Ltd., Zelenograd

Microbial fuel cell (MFC) was used as the primary source of electrical energy collection in the system based on the converter BQ25504 (Texas Instruments). BQ25504 performs the transformation of electrical energy, getting it from microwatt primary sources. Converter goes into the energy storage mode when the starting voltage on the primary source gets 0.33 V. The input operating voltage of 0.1 V is enough to maintain the energy storage mode. The developed system based on converter enables to increase the initial voltage MFC of 0.5 V to 3.1 V; accumulated energy is stored on the various capacitors. This approach is considered as the initial stage of «MFC - converter» study.

Keywords: biofuel cells, electrical converter, practical application

ПРИМЕНЕНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ХИТОЗАНА КАК АДЪЮВАНТА В ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТОКСИЧЕСКИХ ПРОТИВОХОЛЕРНЫХ СЫВОРОТОК

М.В. ОВЧИННИКОВА*, Е.Г. АБРАМОВА, М.Н. КИРЕЕВ

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

Показана эффективность применения биополимера хитозана мол. м. 30 кДа в качестве адъюванта при получении высокоактивных антисывороток к холерному токсину. Применение низкомолекулярного хитозана позволило получить анти-токсические сыворотки с титром специфических антител не ниже, чем при использовании традиционного полного адъюванта Фрейнда. Хитозан, в отличие от полного адъюванта Фрейнда, не оказывал повреждающего действия на органы и ткани животного-продуцента. Использование биополимера позволило сократить общую продолжительность иммунизации, исключив процедуру бустирования.

Ключевые слова: адъювант, холерный токсин, биополимеры, низкомолекулярный хитозан, полный адъювант Фрейнда.

Введение

Современная биотехнология предусматривает разработку сорбционных материалов с целью дальнейшего их использования при конструировании высокоэффективных препаратов для гемо- и энтеросорбции, препаратов иммобилизованных ферментов, тест-систем для иммуноферментного и иммунофлуоресцентного анализа [2]. Для медицинской биотехнологии актуальной является разработка селективных сорбционных материалов с заданными свойствами и дальнейшее их применение в качестве специфических материалов для энтеросорбции [8].

Для получения селективных энтеросорбционных препаратов в основном применяется технология, заимствованная из прикладной энзимологии, — технология физической иммобилизации, которая является наиболее доступным из существующих способов модификации [6]. В качестве активного компонента на поверхности сорбента-носителя могут выступать различные ферменты, консорциумы живых антагонистически активных штаммов бифидо- и лактобактерий, штаммы кишечной палочки [3]. Особый интерес в качестве иммобилизован-

ного агента для конструирования иммуноэнтеросорбентов в целях извлечения антител или антигенов из сложных смесей, представляют иммуноглобулины, полученные из иммунной сыворотки и плазмы крови человека или животных [5].

Первоочередной задачей при получении гетерологичных иммунных сывороток с необходимыми свойствами является разработка оптимальной схемы иммунизации животного-продуцента, в которой учитываются состояние антигена, его дозы, способы, интервалы и кратность введения, общая продолжительность иммунизации, целесообразность применения адъювантов [10].

В практике получения специфических лечебных и диагностических гетерологичных иммунных сывороток для стимуляции антителообразования часто используют адъюванты, наиболее эффективным из которых является полный адъювант Фрейнда (ПАФ), состоящий из смеси минеральных масел, эмульгатора и инактивированных микобактерий [4, 7]. Данный адъювант используется в первых иммунизациях и способствует получению более сильного и сохраняющегося длительное время иммунного ответа.

Однако наряду с высокими показателями стимулирования антителообразования ПАФ обладает высокой реактогенностью, возможностью алергизации и аутоалергизации; микробные компоненты адъюванта вызывают у sensibilizированных животных клинические проявления, имеющие специфическую алергическую природу. Отмечено, что на фоне применения ПАФ часто развиваются гнойно-воспалительные заболевания кожи и

© 2014 г. Овчинникова М.В., Абрамова Е.Г., Киреев М.Н.

* **Автор для переписки:**

Овчинникова Мария Владимировна,
зав. лабораторией диагностических препаратов,
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»
410005 Саратов, Университетская, 46
E-mail: degemot2006@list.ru

мягких тканей, наблюдаются патологические изменения в организме, иногда приводящие к гибели продуцентов [7].

Вопросы, связанные с изучением новых эффективных адъювантных структур, безопасных для продуцентов, до сих пор остаются открытыми из-за нестабильности, реактогенности и дороговизны большинства предложенных вариантов. Все чаще объектами исследований в этом направлении являются биополимеры, и особое место среди них занимают хитозан и его модификации [1]. Доказано, что хитозан является слабым аллергеном, обладает низкими токсичностью и пирогенностью [9]. В зависимости от молекулярной массы хитозан может проявлять сорбционные, бактериостатические, противовоспалительные, иммуномодулирующие свойства [1, 4]. По мнению E.A. McNeela et al. (2004), хитозан мол. м. 10–50 кДа является перспективной адъювантной платформой для интраназальной вакцинации [11]. K. Nishimura et al. (1984) и D. Zaharoff et al. (2007) в своих исследованиях показали, что гели низкомолекулярного хитозана при подкожном введении не только обеспечивают иммунную стимуляцию, но и действуют в качестве депо антигена [12, 13].

В связи с этим целью данной работы явилось изучение эффективности применения биополимера хитозана мол. м. 30 кДа в качестве адъюванта при получении высокоактивных антисывороток к холерному токсину.

Материалы и методы

При получении антитоксических сывороток в качестве продуцентов использовали кроликов породы «шиншилла» массой 2,5–3,0 кг (питомник РосНИПЧИ «Микроб»). Манипуляции с животными проводили в соответствии с Приказом № 267 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации» (2003) и «Положением о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев)» (2003).

Для иммунизации животных использовали антиген — препарат очищенного холерного токсина с содержанием белка 360 мкг/мл, любезно предоставленный сотрудниками лаборатории холерных вакцин РосНИПЧИ «Микроб». В качестве адъювантов применяли ПАФ (Sigma, США) и хитозан пищевой низкомолекулярный мол. м. 30 кДа (ЗАО «Биопрогресс», Россия). Хитозан использовали в виде 0,5%-ного раствора в воде очищенной (ФС 42-2619-97). Гипериммунизацию с использованием ПАФ осуществляли по регламентированной схеме, традиционно используемой в РосНИПЧИ «Микроб» для получения антитоксических сывороток

к *Vibrio cholerae* O1. Первую инъекцию антигена с ПАФ в соотношении 1:1 проводили подкожно в 6–8 точек вдоль хребта с обеих сторон, общее количество введенного холерного токсина составило 100 мкг/мл. Последующие 7 инъекций осуществляли подкожно, без адъюванта, в возрастающих дозах антигена — 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 мкг/мл. Интервалы между введением антигена составили соответственно 1, 5, 3, 3, 5, 3, 4 сут. Гипериммунизацию с адъювантом хитозаном осуществляли аналогично.

Кровь для исследования на наличие специфических антител брали из ушной вены кроликов после 3, 5 и 7 инъекций. Уровень специфических антител в сыворотках определяли в реакции диффузной преципитации по Оухтерлони (РДП) с холерным токсином в концентрации по белку 100 мкг/мл.

Результаты и обсуждение

Перед проведением иммунизации препаратом холерного токсина животные-продуценты были разделены на 3 группы в зависимости от применяемого адъювантного вещества: первую группу (6 гол.) иммунизировали антигеном с ПАФ, вторую (6 гол.) — с низкомолекулярным хитозаном. В качестве контрольной группы были кролики (3 гол.), которым вводили холерный токсин без адъюванта (табл. 1).

Таблица 1

Состав инъекционных смесей

№ п/п	Адъювант	Конечная концентрация адъюванта, %	Конечная концентрация антигена, мкг/мл
1	Полный адъювант Фрейнда	50	100
2	Низкомолекулярный хитозан	0,25	100
3	Контроль — без адъюванта	—	100

Ранее специалистами РосНИПЧИ «Микроб» была разработана оптимальная схема иммунизации кроликов-продуцентов для получения высокоактивных антитоксических сывороток к токсину холерного вибриона в титре не ниже 1:16 в РДП, включающая в себя первую инъекцию минимального количества антигена (100 мкг/мл) с ПАФ, а при необходимости — бустерную инъекцию. Данная схема эффективно применяется и в настоящее время для экспериментально-производ-

ственных и научных исследований, однако замечено, что введение ПАФ часто приводит к образованию абсцессов у животных, изъязвлений на месте введения, ухудшению общего состояния животного, отдаляющему проведение следующей инъекции.

В настоящей работе большой практический интерес представляло сравнительное изучение эффективности использования ПАФ и низкомолекулярного хитозана для стимуляции гуморального иммунного ответа на введение холерного токсина. Оценивали динамику накопления специфических антител при гипериммунизации животных с использованием двух адъювантов различной природы. Определение титра антител в иммунных сыворотках после третьей иммунизации показало, что более сильное иммуностимулирующее действие оказывал ПАФ, титры антител в РДП у животных первой группы составили 1:4, у продуцентов второй группы — 1:2. Пробное взятие крови после пятой инъекции свидетельствовало, что титры антитоксинов в крови животных первой и второй групп возросли одинаково и составили в РДП 1:8. Титры антител в сыворотке животных контрольной группы зарегистрированы на уровне 1:2 (рис. 1).

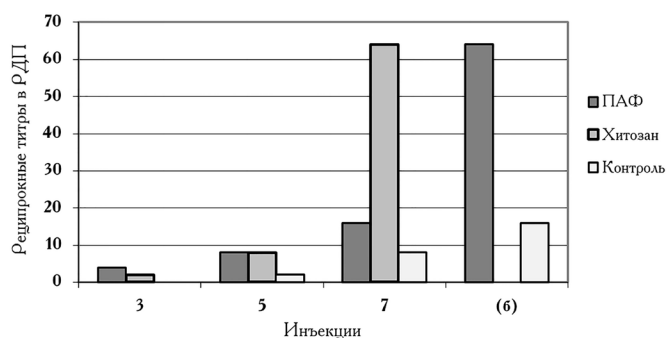


Рис. 1. Динамика накопления антитоксических антител в сыворотках животных-продуцентов в зависимости от применяемого адъюванта

После окончания цикла иммунизации в иммунных сыворотках продуцентов были зарегистрированы следующие значения титров токсин-нейтрализующих антител. При исследовании сывороток животных второй группы, иммунизированных с хитозаном, титры специфических антител отмечены на уровне 1:32 — 1:64, тогда как холерный токсин преципитировал с иммунными сыворотками продуцентов первой группы в разведении 1:16, третьей группы — в разведении 1:8. Однократное бустирование (б) продуцентов первой и третьей групп максимальной дозой антигена (400 мкг/мл) через 7 дней после последней инъекции способствовало нарастанию уровня содержания специфических антител до значения 1:64 и

1:16, соответственно (см. рис. 1). Проведение бустерной инъекции увеличило общую продолжительность иммунизации по сравнению со второй группой и составило соответственно 36 и 24 дня.

На всем протяжении эксперимента контролировали общее состояние и состояние кожных покровов продуцентов. Отмечено, что у всех взятых в опыт животных первой группы имели место необратимые изменения в местах введения смеси адъюванта ПАФ с антигеном в виде сильных изъязвлений. У трех продуцентов наблюдалось повышение температуры тела и угнетение общего состояния организма, в связи с чем было принято решение об отмене очередной инъекции до улучшения состояния животного, что сказалось на сроке иммунизации.

Введение животным второй группы антигена с низкомолекулярным хитозаном привело к образованию незначительных гранул в местах введения антигена у четырех продуцентов, однако данные изменения носили обратимый характер и не влияли на срок проведения следующей иммунизации. Общее состояние всех животных было удовлетворительным. Полученные результаты указывают на то, что низкомолекулярный хитозан является достойной альтернативой традиционно применяемому адъюванту ПАФ.

Нельзя не отметить преимущество хитозана и в плане техники исполнения первых инъекций антигена в смеси с адъювантами. Масляная основа ПАФ затрудняет получение однородной смеси адъюванта с антигеном, интенсивное перемешивание приводит к образованию пены и потере некоторого количества антигенного материала в процессе введения животному. В отличие от ПАФ, водная основа хитозана позволяет биополимеру легко смешиваться с раствором антигена, быстро получая гомогенизированную суспензию, без труда вводимую продуценту.

Заключение

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об эффективности применения биополимера низкомолекулярного хитозана в качестве адъюванта при получении высокоактивных кроличьих иммунных сывороток к экзотоксину холерного вибриона. Полученные высокоактивные антитоксические сыворотки к экзотоксину холерного вибриона могут быть использованы в дальнейшем для выделения антитоксических иммуноглобулинов — активных компонентов для конструирования специфических энтеросорбентов.

Литература

1. Гендон Ю.Э. Живая холодоадаптированная гриппозная вакцина: современное состояние // Вопросы вирусологии. — 2010. — № 1. — С. 4–17.
2. Земсков В.С., Шор-Чудновский М.Е., Картель Н.Т. О возможном механизме лечебного эффекта энтеросорбции // Клиническая хирургия. — 1988. — № 3. — С. 61–62.
3. Бородин Ю.И., Бурмистров В.А., Гуськов А.А., Рачковская Л.Н., Репина В.В., Репин В.Е., Саранина И.В. Комплексный бактериальный препарат // Патент на изобретение RU 2118535 С1. — 1998.
4. Молокаев В.А., Кошевой И.В., Крюкова Л.И., Коробейникова Э.Н. Способ получения иммунных поливалентных сывороток против гистамина и серотонина // Патент на изобретение RU 2129012 С1. — 1999.
5. Зорик А.В., Алешкин В.А., Лютов А.Г., Борисова И.В. Способ получения иммуноглобулинового препарата // Патент на изобретение 2189833 RU С1. — 2002 г.
6. Тривен М. Имобилизованные ферменты. Вводный курс и применение в биотехнологии. — М., 1983. — 216 с.
7. Федотов Ю.Н., Кадыров С.О. Технология получения моноспецифических сывороток к иммуноглобулинам животных / Труды ВИЭВ, 1988. — Т. 66. — С. 41–46.
8. Филь А.А. Биотехнология получения сорбционных материалов (энтеросорбентов) с заданными свойствами: дис... канд. биол. наук. — Ставрополь, 2006. — 125 с.
9. Хотимченко Ю.С., Ермак И.М., Бедняк А.Е., Хасина Э.И., Кропотов А.В., Коленченко Е.А., Сергущенко И.С., Хотимченко М.Ю., Ковалев В.В. Фармакология некрахмальных полисахаридов // Вестник ДВО РАН. — 2005. — № 1. — С. 72–82.
10. Чард Т. Радиоиммунологические методы. — М: Мир, 1981. — 246 с.
11. McNeela E.A., Jabbal-Gill I., Illum L., Pizza M. Intranasal immunization with genetically detoxified diphtheria toxin induces T cell responses in humans: enhancement of Th2 responses and toxin-neutralizing antibodies by formulation with chitosan // Vaccine. — 2004. — Vol. 22. — No. 8. — P. 909–914.
12. Nishimura K., Nishimura S., Nishi N., Saiki I. Immunological activity of chitin and its derivatives // Vaccine. — 1984. — Vol. 2. — No. 1. — P. 93–99.
13. Zaharoff D.A., Rogers C. J., Hance K.W., Schlom J., Greiner J.W. Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination // Vaccine. — 2007. — Vol. 25. — No. 11. — P. 2085–2094.

THE USE OF LOW MOLECULAR WEIGHT CHITOSAN AS AN ADJUVANT IN THE PRODUCTION TECHNOLOGY ANTITOXIC SERA CHOLERA

M.V. OVCHINNIKOVA, E.G. ABRAMOVA, M.N. KIREEV

Russian Research Institute for Plague Control «Microbe», Saratov

The efficiency of the biopolymer chitosan mol. m. 30 kDa as an adjuvant in the preparation of antisera to highly cholera toxin was demonstrated. The use of low molecular weight chitosan yielded antitoxic serum titer of specific antibodies is not lower than with traditional complete Freund's adjuvant. Chitosan unlike complete Freund's adjuvant had no damaging effect on organs and tissues-producing animal. Using biopolymer reduced the total duration of the immunization procedure excluding a boost.

Keywords: adjuvant, cholera toxin, biopolymers, low molecular weight chitosan, Freund's complete adjuvant.

ОБОСНОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ БЕЗОПАСНОСТИ ДЛЯ ИКРЫ ЛЕТУЧИХ РЫБ СУШЕНОЙ И СОЛЕННОЙ СУШЕНОЙ

Е.А. АХМЕРОВА^{1*}, Л.Р. КОПЫЛЕНКО², Л.Д. КУРЛАПОВА²

¹ ФГОУ ВПО «Российский университет дружбы народов»,

² ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии»,
Москва

В связи с увеличением потребления икры летучих рыб — «Тобико» — в России за последнее десятилетие, а также из-за отсутствия требований к содержанию токсикантов и уровню микробиологических показателей ввозимого сушеного и соленого сушеного сырья для изготовления готового продукта актуальным является вопрос исследования и обоснования показателей безопасности. В работе приведены результаты исследований икры-полуфабриката летучих рыб и рекомендуемые допустимые уровни микробиологических показателей для сушеной и соленой сушеной икры.

Ключевые слова: икра летучих рыб, токсиканты, показатели безопасности.

Введение

Летучие рыбы являются перспективным объектом промысла, их мировые запасы, по данным разных исследователей, составляют от 1,5 до 4 млн. т [1, 12–14, 16–18].

Потребление икры летучих рыб в России в среднем за месяц составляет около 100 тонн. Икра летучих рыб дороже икры мойвы, пинагора, минтая, других видов рыб и по стоимости сопоставима с икрой лососевой.

В Россию икру летучих рыб импортируют из Китая, Индонезии, Японии, Перу. Икру летучих рыб, собранную с водорослей, в основном заготавливают в виде сушеного (до 28–30% воды), соленого сушеного (до 25–30% воды и 10% поваренной соли) и соленого замороженного (до 70% воды и от 10 до 19% соли) полуфабриката.

Анализ нормативных документов показывает, что в «Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требованиях к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)», а также в СанПиН 2.3.2.78-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» отсутствуют требования на импортируемую сушеную и соленую сушеную икру летучих рыб. Это обстоятельство, по-видимому, свя-

зано с тем, что сушеная и соленая сушеная икра для России является новым видом сырья и техническая документация на изготовление из этого сырья икры летучих рыб соленой до настоящего времени отсутствовала.

В группе продуктов, включающей икру других видов рыб (кроме осетровых и лососевых), а именно: пробойную соленую, ястычную слабосоленую, копченую и вяленую, для которых регламентируются микробиологические показатели, икра летучих рыб также отсутствует.

Сушеная и соленая сушеная икра летучих рыб является не готовым продуктом, а полуфабрикатом, который подвергается многократной технологической обработке — промыванию, восстановлению, посолу, окрашиванию, смешиванию со вкусо-ароматическими добавками для придания внешнего вида, консистенции, вкуса, свойственных готовому продукту. Поэтому нормируемые микробиологические показатели сушеного полуфабриката икры летучих рыб и готовой продукции могут не совпадать.

Цель исследований — обоснование показателей безопасности сушеной, соленой сушеной и соленой замороженной икры летучих рыб, импортируемой в Россию и направляемой на восстановление и изготовление готовой продукции.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали образцы икры-полуфабриката летучих рыб семейства *Echocoetidae* соленой, соленой сушеной и соленой замороженной (рис. 1).

© 2014 г. Ахмерова Е.А., Копыленко Л.Р., Курлапова Л.Д.

* Автор для переписки:

Ахмерова Елена Ахатовна

к.т.н., старший преподаватель кафедры стандартизации, метрологии и технологии производства продукции животноводства ФГОУ ВПО «РУДН»

117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8

E-mail: akhmerovaelena@mail.ru.



Рис. 1. Икра летучих рыб: а — сушеная, б — соленая сушеная, в — соленая замороженная

Содержание кадмия и свинца определяли по ГОСТ 30178-96 [5], мышьяка — по ГОСТ Р 51766-2001 на атомно-абсорбционном спектрофотометре «Shimadzu» AA6701 после сухого озоления [8]; ртуть — на анализаторе «Nippon Corporation»; пестициды и полихлорированные бифенилы — на газовом хроматографе MEGA, CarloErba с ЭЗД [11, 19]; содержание радионуклидов — цезия-117 и стронция-90 — по МУК 2.6.1.1194-03 [15].

Микробиологические показатели определяли по ГОСТ Р 29185-91, ГОСТ 10444.15-94, ГОСТ 10444.2-94, ГОСТ 51921-02, ГОСТ Р 52814-2007, ГОСТ 52815-2007, ГОСТ Р 52816-2007 [2–4, 6, 7, 9, 10].

Результаты и обсуждение

Анализ данных, приведенных в таблице 1, свидетельствует о том, что содержание свинца и мышьяка в различных образцах сушеной икры колеблется от 0,003 до 0,006 мг/кг; содержание кадмия — от 0,002 до 0,003 мг/кг; ртути — от 0,004 до 0,007 мг/кг.

Содержание токсичных элементов в образцах соленой сушеной икры незначительно выше, по-видимому,

за счет содержания в них поваренной соли, массовая доля которой составляла от 8 до 12%; количество токсичных элементов в мг/кг варьирует: кадмия — от 0,002 до 0,005, мышьяка — от 0,004 до 0,005, свинца — от 0,004 до 0,008, ртути — от 0,006 до 0,009.

Содержание кадмия в образцах соленой замороженной икры не превышает 0,002 мг/кг, содержание свинца, мышьяка и ртути составляет от 0,002 до 0,003 мг/кг. Более низкие значения показателей являются следствием высокого содержания воды в соленой икре — 60–70%.

Содержание токсичных элементов в сушеной и соленой сушеной икре значительно ниже значений, нормируемых для группы сушеных рыбных продуктов. Содержание ртути, кадмия, мышьяка и свинца в соленой замороженной икре также ниже нормируемых значений на 2–3 порядка для группы продуктов «Икра и молоки рыб».

Из числа хлорорганических пестицидов содержание ГХЦГ и α -, β -, λ -изомеров в образцах сушеной, соленой сушеной и соленой замороженной икры довольно низкое и составляет от <0,001 до 0,001 мг/кг (табл. 2). Содержание ДДТ и метаболитов также низкое и колеблется в диапазоне от <0,001 до 0,009 мг/кг.

Таблица 1

Содержание токсичных элементов в икре летучих рыб сушеной, соленой сушеной и соленой замороженной (N=10)

Наименование	Фактическое значение, мг/кг		
	сушеная	соленая сушеная	соленая замороженная
Свинец	0,003–0,006	0,004–0,008	0,002–0,003
Мышьяк	0,003–0,005	0,004–0,005	0,002–0,003
Кадмий	0,002–0,003	0,002–0,005	0,001–0,002
Ртуть	0,004–0,007	0,006–0,009	0,002–0,003

Содержание хлорорганических токсикантов в сушеной, соленой сушеной и соленой замороженной икре летучих рыб (N=10)

Наименование	Фактическое значение, мг/кг		
	сушеная	соленая сушеная	соленая замороженная
ГХЦГ и α -, β -, λ -изомеры	<0,001–0,001	<0,001–0,001	<0,001–0,001
ДДТ и метаболиты	<0,001–0,009	<0,001–0,009	<0,001–0,009
Полихлорированные бифенилы	0,001–0,005	0,001–0,005	0,001–0,002

Содержание полихлорированных бифенилов в образцах соленой замороженной икры не превышает 0,002 мг/кг, а в образцах сушеной и соленой сушеной колеблется от 0,001 до 0,005 мг/кг, что значительно ниже нормируемого значения для икры рыб — 0,2 мг/кг.

В «Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требованиях к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)», а также в СанПиН 2.3.2.1078-01 имеются нормативы на содержание токсикантов для группы рыбных продуктов «Икра и молоки рыб и продукты из них: аналоги икры». Анализ данных свидетельствует о том, что соленая замороженная икра летучих рыб по содержанию хлорорганических токсикантов соответствует требованиям нормативных документов.

Содержание радионуклидов — цезия-117 и стронция-90 — в исследованных образцах сушеной, соленой сушеной и соленой замороженной икры летучих рыб составляло менее 38 и 45 Бк/кг, что не превышает нормируемые значения 260 и 200 Бк/кг соответственно для цезия-117 и стронция-90.

Учитывая, что значения нормируемых токсикантов и радионуклидов сушеной икры значительно ниже значений регламентируемых показателей икры рыб, можно утверждать, что сушеная и соленая сушеная икра летучих рыб соответствует санитарным требованиям, предъявляемым к группе «Икра и молоки рыб», и соответствует Единым требованиям Таможенного союза.

Результаты микробиологических исследований, представленные в таблице 3, показали, что общая микробная обсемененность образцов из разных партий сушеной икры летучих рыб, подлежащей восстановлению, посолу и окрашиванию, колеблется от $1,0 \times 10^4$ до $1,0 \times 10^7$ КОЕ/г. При этом содержание количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) в 1,0 г выше $5,4 \times 10^4$ КОЕ/г сопровождается наличием бактерий группы кишечных палочек в

0,1 г, сульфитредуцирующих клостридий в 1,0 г, а также наличием дрожжей, содержание которых составляет от 50 до 300 КОЕ в 1,0 г.

Как видно из таблицы 3, в образцах соленой сушеной икры (также подлежащей восстановлению, посолу и окрашиванию) при отсутствии бактерий группы кишечных палочек (БГКП), сульфитредуцирующих клостридий и дрожжей общая микробная обсемененность варьирует в меньшем диапазоне — от $2,2 \times 10^2$ до $3,2 \times 10^3$ КОЕ/г — и на 1–3 порядка ниже, чем в образцах сушеной икры. Это, по-видимому, можно объяснить первичной обработкой сырья — промыванием собранной икры и консервирующим действием поваренной соли.

КМАФАнМ в образцах соленой замороженной икры, предназначенной для размораживания, промывания, посола и окрашивания, колебалось от $3,1 \times 10^3$ до $1,0 \times 10^7$ КОЕ/г. Из одиннадцати исследованных партий в образцах от четырех партий были обнаружены бактерии группы кишечных палочек в 0,1 г; в образцах от пяти партий выделены сульфитредуцирующие клостридии в 1,0 г; содержание дрожжей не превышало значение, нормируемое для пробойной икры рыб мороженой.

Во всех образцах из исследованных партий сушеной, соленой сушеной и соленой замороженной икры не были обнаружены патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы — в 25 г, *Listeriamonocytogenes* — в 25 г и *Staphylococcus aureus* — в 0,01 г.

Таким образом, анализ полученных результатов показывает, что микробная обсемененность соленой сушеной икры не превышает $4,1 \times 10^3$ КОЕ/г; ни в одной из десяти партий не обнаружены бактерии группы кишечных палочек, сульфитредуцирующие бактерии и дрожжи в отличие от сушеной и соленой замороженной икры. В то же время в восьми партиях сушеной икры из десяти обнаружены сульфитредуцирующие клостридии и в четырех — бактерии группы кишечных палочек.

**Микробиологические показатели образцов сушеной,
соленой сушеной и соленой замороженной икры летучих рыб**

№ п/п	Микробиологические показатели						
	КМАФАнМ КОЕ в 1,0 г	БГКП (ко- лиформы) в 0,1 г	<i>Staphylococcus aureus</i> в 0,01 г	Сульфитредуциру- ющие клостридии в 1,0 г	Патогенные, в т.ч. сальмонел- лы в 25 г	Плесени, КОЕ в 1,0 г	Дрожжи, КОЕ в 1,0 г
Сушеная							
1	$8,0 \times 10^4$	выделены	не выд.	выделены	не выд.	$1,7 \times 10^3$	100
2	$2,4 \times 10^4$	выделены	не выд.	выделены	не выд.	$5,0 \times 10^1$	50
3	$1,0 \times 10^7$	выделены	не выд.	выделены	не выд.	$1,5 \times 10^3$	300
4	$1,0 \times 10^6$	выделены	не выд.	выделены	не выд.	$5,0 \times 10^3$	не выд.
5	$3,1 \times 10^6$	выделены	не выд.	выделены	не выд.	не выд.	300
6	$5,4 \times 10^4$	не выд.	не выд.	выделены	не выд.	$5,0 \times 10^1$	не выд.
7	$5,0 \times 10^4$	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.
8	$8,0 \times 10^4$	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.
9	$7,8 \times 10^4$	выделены	не выд.	выделены	не выд.	200	не выд.
10	$1,0 \times 10^5$	выделены	не выд.	выделены	не выд.	не выд.	не выд.
Соленая сушеная							
11	$4,0 \times 10^2$	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.
12	$3,2 \times 10^3$	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.
13	$1,0 \times 10^3$	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.
14	$1,3 \times 10^3$	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.
15	$2,1 \times 10^3$	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.
16	$3,6 \times 10^2$	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.
17	$4,1 \times 10^3$	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.
18	$2,8 \times 10^3$	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.
19	$3,1 \times 10^3$	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.
20	$2,2 \times 10^2$	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.
Соленая замороженная							
21	$3,0 \times 10^6$	выделены	не выд.	выделены	не выд.	не выд.	300
22	$5,2 \times 10^3$	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.
23	$1,0 \times 10^6$	выделены	не выд.	выделены	не выд.	не выд.	100
24	$5,5 \times 10^5$	выделены	не выд.	выделены	не выд.	не выд.	не выд.
25	$3,1 \times 10^3$	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.
26	$4,4 \times 10^4$	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	50
27	$5,0 \times 10^3$	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.
28	$1,0 \times 10^7$	выделены	не выд.	выделены	не выд.	не выд.	200
29	$1,7 \times 10^4$	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	70
30	$7,4 \times 10^4$	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.	не выд.
31	$5,9 \times 10^5$	выделены	не выд.	выделены	не выд.	не выд.	100

Довольно высокая микробная обсемененность соленой замороженной икры, наличие в четырех партиях из десяти бактерий группы кишечных палочек и в пяти — сульфитредуцирующих бактерий могут быть косвенным свидетельством того, что икра соленая была приготовлена с нарушением технологии изготовления и хранения или с нарушением требований санитарного состояния производства.

Результаты микробиологических исследований свидетельствуют о том, что для уменьшения микробной обсемененности сушеной икры и обеспечения микробной безопасности готового продукта сушеную икру перед изготовлением необходимо подвергать предварительной обработке. Соленая сушеная икра не требует предварительной обработки.

В ходе проведения работ по экспертизе икры летучих рыб было отмечено, что образцы сушеной икры, хранившиеся в замороженном состоянии, по микробиологическим показателям превосходили образцы икры, хранившиеся в нерегулируемых температурных условиях. Результаты выполненных нами исследований показали, что образцы сушеной икры летучих рыб с микробной обсемененностью $5,4 \times 10^4$ КОЕ/г через 2 месяца хранения при температуре -18°C сохраняли значение этого показателя, в то время как в образцах, хранившихся при температуре 20°C , микробная обсемененность увеличилась почти на 2 порядка.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что для обеспечения качества икры летучих рыб соленой необходимо заготавливать икру в солено-сушеном виде и хранить при температуре -18°C предпочтительно в герметичной упаковке.

Анализ значений микробиологических показателей, регламентируемых для готовой продукции, свидетельствует о том, что в вяленой икре (готовой к употреблению продукции) регламентируется 1×10^5 КМАФАнМ КОЕ/г, не более 50 КОЕ/г плесеней, не более 300 КОЕ/г дрожжей, бактерии группы кишечных палочек не допускаются в 0,1 г, *Staphylococcus aureus* и

сульфитредуцирующие бактерии — в 1,0 г, патогенные, в том числе сальмонеллы, не допускаются в 25 г.

В то же время в вяленой рыбной продукции КМАФАнМ нормируется на уровне 5×10^4 КОЕ/г, плесени — не более 50 КОЕ/г, дрожжи — не более 100 КОЕ/г, бактерии группы кишечных палочек не допускаются в 0,1 г, сальмонеллы — в 25 г, сульфитредуцирующие бактерии — в 1,0 г только для упакованной под вакуумом продукции, *Staphylococcus aureus* не регламентируются.

Для готовой продукции — рыбы сушеной установлено аналогичное количество КМАФАнМ — 5×10^4 КОЕ/г, бактерии группы кишечных палочек также не допускаются в 0,1 г, сальмонеллы — в 25 г, сульфитредуцирующие бактерии — в 0,1 г только для упакованной под вакуумом продукции, *Staphylococcus aureus* не регламентируются.

Заключение

Таким образом, анализ нормативных материалов по гигиеническим требованиям безопасности различных видов продукции из водных биоресурсов показывает, что для готовой продукции — икры пробойной соленой, ястычной малосоленой, копченой и вяленой КМАФАнМ нормируется на уровне 1×10^5 КОЕ/г. Сульфитредуцирующие клостридии регламентируются в основном для готовой продукции, упакованной под вакуумом. Поскольку для морских рыб нормируется *Vibrio parahaemolyticus*, считаем, что этот показатель необходимо регламентировать и для икры летучих рыб.

На основании вышеизложенного считаем обоснованными допустимые уровни микробиологических показателей, представленные в таблице 4.

Обоснованные допустимые уровни микробиологических показателей направлены в Минсельхоз России для включения в Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю).

Таблица 4

Рекомендуемые допустимые уровни микробиологических показателей для сушеной и соленой сушеной икры летучих рыб

Микробиологические показатели		Значение показателя
КМАФАнМ, КОЕ/г, не более		5×10^5
Масса продуктов (г), в которой не допускаются:	БГКП (колиформы)	0,001
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,01
	Патогенные (в том числе сальмонеллы)	25
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , КОЕ/г, не более		100

Литература

1. Беклемишев К.В., Пастернак Ф.А. Количественный учет летучих рыб в Атлантике и вопрос об оценке продуктивности тропических вод // Вопросы ихтиологии. — 1960. — Вып. 14. — С. 26–30.
2. ГОСТ 10444.15-94 Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.
3. ГОСТ 10444.2-94 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества *Staphylococcus aureus*.
4. ГОСТ 29185-91 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества сульфитредуцирующих кластридий.
5. ГОСТ 30178-96 — Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов.
6. ГОСТ 51921-02 Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий.
7. ГОСТ 52815-2007 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*.
8. ГОСТ Р 51766-2001 — Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения мышьяка.
9. ГОСТ Р 52814-2007. Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*.
10. ГОСТ Р 52816-2007 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек.
11. ГОСТ Р 53184-2008 Рыба, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Определение содержания диоксинов и диоксинподобных полихлорированных бифенилов хромато-масс-спектральным методом.
12. Зуев Г.В., Никольский В.Н. О методике количественного учета летучих рыб семейства *Echocoetidae* // Вопросы ихтиологии. — 1980. — Вып. 6(125). — С. 935–937.
13. Максимов Ю.М. О перспективах освоения запасов и технике лова летучих рыб / Биологические ресурсы открытого океана. — М.: Наука, 1973. — С. 221–225.
14. Моисеев П.А. Биологические ресурсы Мирового океана и перспективы их использования / Проблемы исследования и освоения Мирового океана. — М., 1978. — С. 290.
15. МУК 2.6.1.1194-03 Радиационный контроль. Стронций-90 и цезий-137. Пищевые продукты. Отбор проб, анализ и гигиеническая оценка. Методические указания.
16. Парин Н.В. Летучие рыбы (*Echocoetidae* и *Oxurorhamphidae*) Японского моря и сопредельных вод // Вопросы ихтиологии. — 1962. — Т. 2. — Вып. 2(23). — С. 224–229.
17. Саускан В.И. О биомассе некоторых видов летучих рыб в восточной части тропической Атлантики // Тр. Атлантиро. — 1973. — Вып. 53. — С. 150–153.
18. Шунтов В.П. Распределение летучих рыб в Тонкинском заливе в зависимости от океанографических факторов // Труды ИОАН. — 1965. — Т. 80. — С. 118–124.
19. EPA-METHOD 1656 Organo-halide pesticides in waster water, soil, sludge, sediment and tissue by GC/HSD revision.

Список сокращений:

БГКП — бактерии группы кишечных палочек,
 КМАФАнМ — количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов,
 КОЕ — колониеобразующие единицы

JUSTIFICATION OF SAFETY PERFORMANCE FOR FLYING FISH ROE DRIED AND SALTED DRIED

E.A. AHMEROVA¹, L.R. KOPYLENKO², L.D. KURLAPOVA²

¹ *People's Friendship University of Russia,*

² *All-Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow*

Due to the increasing consumption of flying fish roe — «Tobiko» — in Russia over the past decade, as well as due to lack of requirements for the content of toxicants and microbiological indicators of the level of imported dried and salted dried raw materials for the manufacture of the finished product is a relevant research question and study performance security. The results of studies of caviar of flying fish semi-finished and recommended acceptable levels of microbiological indicators for dried and salted dried eggs.

Keywords: flying fish roe, toxicants, safety performance.

ИМПЕДАНСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ В СОВРЕМЕННЫХ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ ДНК-БИОСЕНСОРАХ

С.Е. ТАРАСОВ^{1*}, В.В. ЕМЕЦ², М.А. ГУТОРОВ³, А.Н. РЕШЕТИЛОВ¹

¹ ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Пушино, Московская область;

² ФГБУН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва;

³ ООО «Гамма», Москва, Зеленоград

В обзоре представлены некоторые современные подходы к электрохимической регистрации процессов, связанных с ДНК (гибридизация, взаимодействие с лигандами, полиморфизм). Рассматриваются описанные в литературе ДНК-биосенсоры на основе электрохимической импедансной спектроскопии (ЭИС) и возможность применения ЭИС в методах секвенирования ДНК нового поколения.

Ключевые слова: импеданс, одноцепочечная ДНК, гибридизация, геносенсор, ДНК-биосенсор, электрохимическая импедансная спектроскопия, электрохимическое секвенирование.

Введение

Открытие молекул ДНК повлекло за собой развитие технологий, направленных на изучение этих структур. При исследованиях молекул ДНК используют электрохимические сенсоры, обеспечивающие высокую чувствительность, высокую селективность и низкую стоимость решения таких задач, как определение нуклеотидной последовательности ДНК. При этом под ДНК-сенсорами в литературе часто понимают два отличающихся друг от друга понятия: электрохимические сенсоры на основе одноцепочечных ДНК и электрохимические сенсоры, предназначенные для определения ДНК [12]. В первом случае слой одноцепочечных ДНК иммобилизован на поверхности электрода и является частью сенсора, во втором же случае сама молекула ДНК или продукты любого превращения ДНК, производящегося в растворе или на другой твердой поверхности, определяются электрохимическим сенсором. В настоящем обзоре внимание будет уделено обоим вариантам электрохимических сенсоров, связанных с ДНК.

В работе с биосенсорами на основе ДНК используются различные принципы детекции. В первую

очередь, это — безметочные методы, использующие электрохимическую активность ДНК, основанную на присутствии окислительно-восстановительных изменений в нуклеотидах и остатках сахаров. Другой подход к изучению внутренней электрохимической активности ДНК — использование редокс соединений для определения присутствия иммобилизованной ДНК или детекции таких процессов, как гибридизация, повреждение и взаимодействие ДНК с другими соединениями. Этот метод также был использован в первых работах, посвященных ДНК-биосенсорам, используемым для секвенирования ДНК. Такой метод все еще можно назвать безметочным, но он уже не является безреагентным, поскольку в процессе детекции в ячейку вводятся дополнительные соединения. И, наконец, существуют методы, использующие для детекции специальные метки, ковалентно связанные с ДНК. Эти метки позволяют значительно увеличить аналитическую селективность и чувствительность, например, для процесса гибридизации ДНК [15].

Рабочие электроды, используемые в ДНК-биосенсорах, отличаются большим разнообразием, но преимущественно используются электроды на основе золота [8, 11], углерода [3, 9] или кремния [17]. Известно множество методов иммобилизации ДНК на поверхности сенсоров, кроме того, отличаются и методы электрохимической детекции. Чаще всего используется либо вольтамперометрический, либо хронопотенциометрический режим измерения [15], но в связи с возросшей популярностью импедансометрических биосенсоров

© 2014 г. Тарасов С.Е., Емец В.В., Гуторов М.А., Решетиллов А.Н.

* **Автор для переписки:**

Тарасов Сергей Евгеньевич

аспирант Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН

142290 Пушино Московской обл.

E-mail: setar25@gmail.com

электрохимическая импедансная спектроскопия также стала распространенной измерительной техникой для ДНК-биосенсоров [14]. Данные сенсоры имеют очевидную перспективу как аналитические устройства, применяемые для медицинских целей, а именно: для анализа специфических случаев диагностики, для выполнения многофункциональных анализов. Их главным преимуществом следует считать быстроту выполнения анализа и низкую стоимость.

Целью настоящей работы является обзор современных электрохимических ДНК-биосенсоров, в большинстве своем основанных на применении электрохимической импедансной спектроскопии. Особое внимание в статье уделяется новейшим работам, опубликованным в 2014 году и посвященным сенсорам на основе процесса гибридизации ДНК.

Импедансные ДНК-сенсоры на основе процесса гибридизации

Наиболее часто используются биосенсоры, основанные на процессе гибридизации ДНК, называемые также «геносенсорами». Рецепт в таких сенсорах является слой одноцепочечных ДНК, иммобилизованный на поверхности электрода, а детектируется построение двойной спирали ДНК с участием иммобилизованной пробы и комплементарных цепей ДНК или отдельных нуклеотидов, находящихся в анализируемом растворе. Значительный интерес представляет поиск новых методов электронной регистрации процедуры трансдукции (переноса генов из одной бактериальной клетки в другую при помощи бактериофага), среди которых можно выделить импедансометрическое детектирование. Этот метод находит в последнее время все большее применение при разработке различных биосенсоров. Спектроскопия электрохимического импеданса позволяет анализировать изменение свойств межфазных границ, обусловленное биоэлектрохимическими событиями на поверхности электродов, а также исследовать кинетику и механизм переноса заряда биокаталитических реакций, происходящих на модифицированных электродах [5].

Встраивание комплементарного нуклеотида в одноцепочечную ДНК при работе ДНК-полимеразы сопровождается выделением иона водорода и пирофосфата, а также увеличением отрицательного заряда растущей ДНК-цепи. В общем случае процессы в ячейке импедансометрических ДНК-биосенсоров могут быть описаны эквивалентной схемой Эршлера — Рэнделса (рис. 1), которая состоит из трех основных элементов R_s , R_{ct} и

C_{dl} . Каждый из этих элементов можно использовать для детектирования процесса гибридизации ДНК.

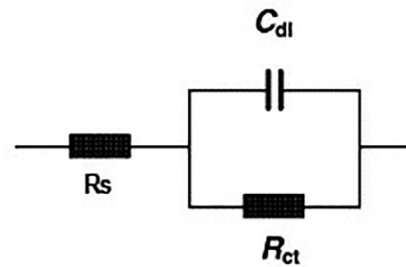


Рис. 1. Эквивалентная схема Эршлера — Рэнделса, используемая для описания процессов в ячейке импедансометрических ДНК-биосенсоров.

R_s — высокочастотное сопротивление, включающее в себя сопротивление электролита, а также сопротивление проводов и контактов между потенциостатом и ячейкой. Величина R_s зависит от электропроводности, площади поверхности электродов и расстояния между электродами.

R_{ct} — сопротивление переноса заряда через межфазную границу электрод-электролит. Величина R_{ct} зависит от площади поверхности электродов, скорости электрохимической реакции, концентрации электроактивных частиц в растворе и приложенного потенциала.

C_{dl} — емкость двойного электрического слоя (ДЭС). Величина C_{dl} зависит от материала электрода, концентраций электролита.

В соответствии со схемой Эршлера — Рэнделса в рамках импедансометрического метода:

1) можно детектировать изменение сопротивления электролита R_s (электропроводности) из-за изменения концентрации протонов в растворе при гибридизации ДНК;

2) если дополнительно внести в электролит редокс-пару, состоящую из отрицательно заряженных ионов, то можно детектировать изменение R_{ct} . После гибридизации иммобилизованной ДНК растет отрицательный заряд ДНК. Это усиливает отталкивание отрицательных редокс-частиц, в результате чего R_{ct} возрастает;

3) можно детектировать изменение емкости C_{dl} , так как при гибридизации иммобилизованной ДНК диэлектрическая проницаемость ДЭС снижается, а толщина ДЭС увеличивается; в результате C_{dl} снижается.

Рассмотрим использование импедансной спектроскопии для детектирования биохимических реакций на поверхности электрода.

Работа ДНК-сенсора основана на взаимодействии между комплементарными цепочками ДНК, одни из которых — «мишени» — иммобилизованы на поверхности

электрода, а другие — «цели» — свободно диффундируют в растворе (рис. 2). Принцип детекции процесса гибридизации ДНК описан в работе [11], авторы которой предлагают метод детекции гибридизации ДНК на золотом электроде с помощью импедансной спектроскопии. Для импедансометрического детектирования гибридизации ДНК в раствор вводят отрицательно заряженные окислительно-восстановительные метки, например, многозарядные отрицательные ионы, такие как $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$. Синтез двухцепочечной ДНК увеличивает отрицательный заряд на границе раздела, которая в результате отталкивает отрицательные ионы метки (см. рис. 2). Это приводит к повышению сопротивления переноса электрона R_{ct} . Измерения импеданса сенсорного электрода до и после гибридизации ДНК показали, что последняя приводит к значительному возрастанию сопротивления переноса заряда R_{ct} с 330 ± 75 Ом до 1150 ± 250 Ом после гибридизации ДНК. Таким образом, спектроскопия фарадеевского импеданса представляет эффективное средство для отслеживания адсорбции и характеристики процессов ДНК-гибридизации на электронном уровне, а R_{ct} может использоваться как сенсорный параметр.



Рис. 2. Схема детекции процесса гибридизации ДНК с использованием окислительно-восстановительных меток

В обзорной работе [2] рассмотрено современное состояние ДНК-сенсоров, которые используют импедансную спектроскопию в качестве метода детекции.

Авторы данного обзора обращают внимание на то, что импедансометрические геносенсоры являются привлекательными инструментами для детекции гибридизации ДНК из-за их потенциала для простого, быстрого, недорогого и не требующего меток секвенирования. В последнее время в литературе описаны приложения импедансометрии к геносенсорам с использованием как нефарадеевских измерений, включающих в себя определение емкости, так и фарадеевских измерений с использованием редокс-индикаторов, контролирующих изменение сопротивления на проводящих и полупро-

водящих поверхностях. В первом случае измеряемым параметром является емкость двойного электрического слоя, сформированного в растворе, над поверхностью электрода. Во втором же случае, называемом фарадеевской импедансной спектроскопией, окислительно-восстановительные соединения, специально добавленные в рабочий раствор, окисляются или восстанавливаются на поверхности электрода. Кроме того, представлены и импедансометрические геносенсоры, использующие дополнительные метки для повышения предела обнаружения и увеличения чувствительности. В целом же импедансометрические ДНК-сенсоры чрезвычайно просты в эксплуатации и способны достичь низкого предела обнаружения даже без какого-либо усиления сигнала. В сочетании с дополнительным усилением сигнала их абсолютные пределы обнаружения могут быть сопоставимы с геносенсорами любого другого типа.

В последние 10 лет увеличилось использование наноматериалов во многих технологиях, в том числе они стали широко использоваться и в производстве электрохимических биосенсоров. Уникальные свойства наноматериалов представляют новые возможности для разработки более сложных электроаналитических ДНК-сенсоров. В случае импедансометрических геносенсоров наноматериалы используются в двух разных качествах. Некоторые работы в литературе посвящены изучению и разработке новых сенсорных поверхностей, основанных на наноматериалах, целью чего является улучшение импедансометрического ответа (увеличение чувствительности или воспроизводимости результатов) [7]. Вторая же часть работ основана на использовании олигонуклеотидов, помеченных различными типами наночастиц с целью улучшения сигнала [16]. К наноматериалам, используемым в качестве сенсорных поверхностей, относят углеродные нанотрубки, графен, наноструктурированный кремний, наночастицы золота и наноструктурные полимеры. Частицы золота также могут использоваться и в качестве меток. Так, в работе [20] описывается платформа на основе электрода из оксида индия-олова, модифицированного наночастицами золота. В качестве методов детекции авторами использовались ЭИС и поверхностный плазмонный резонанс (ППР). С помощью этих двух методов определялась гибридизация ДНК, связанная со специфической мутацией гена Аполипопротеина Е (АпоЕ), с которой связано прогрессирование болезни Альцгеймера. Модифицированные такими наночастицами электроды, но уже с применением углеродных нанотрубок, используются в другой важнейшей области медицинских исследований — в исследованиях рака [6]. Авторами показано на примере

мутаций известного гена *TP53*, что платформа на основе ЭИС и нанотрубок позволяет добиться серьезного улучшения чувствительности сенсора при мутациях данного гена, а значит, в перспективе представляет собой и хорошую базу для получения чувствительного биосенсора для быстрого скрининга мутаций, связанных с большинством известных науке типов рака человека.

Большое внимание исследователей направлено на выбор материалов для детекции гибридизации ДНК с помощью импедансной спектроскопии. Еще в 2004 году в работе [25] был описан селективный и чувствительный биосенсорный метод для измерения гибридизации ДНК с помощью ЭИС. Подход к детекции опирался на легирование проб нуклеиновых кислот в электрополимеризованные полипиррольные пленки на электроде, модифицированном карбоксилированными многостенными углеродными нанотрубками (MWNTs-COOH), и мониторинг изменений импеданса, вызванных металлизацией спирали ДНК после гибридизации. В результате гибридизации и формирования металлизированной двойной ДНК (М-ДНК) наблюдались значительные изменения в значениях электрохимического импеданса (как в случае реального компонента Z_{re} , так и в случае мнимого компонента Z_{im}), что можно объяснить изменением значения сопротивления электронному переносу. Этот метод показал высокую чувствительность с пределом обнаружения в 5×10^{-11} М. Кроме того, авторами были рассмотрены различные металлы, способные участвовать в образовании М-ДНК, и было выяснено, что Zn^{2+} -ДНК обладает большей способностью к электронному транспорту, чем Co^{2+} -ДНК и Ni^{2+} -ДНК при одинаковых условиях.

В работе [10] в качестве сенсорной платформы для детекции гибридизации ДНК используется нанопористый углерод. Авторы работы отмечают, что, несмотря на широкое использование в биосенсорах таких углеродных материалов, как графит, графитовая паста, углеродные нанотрубки или графен, нанопористый углерод до сих пор широко не применялся в биосенсорах. Впервые показано применение нанопористого углерода с использованием техники импедансной спектроскопии для детекции гибридизации и полиморфизма ДНК. Эти исследования подтвердили возможность использования нанопористого углерода в анализе нуклеиновых кислот и показали способность углерода к детекции однонуклеотидного полиморфизма. Авторы указывают на то, что детекция гибридизации и полиморфизма ДНК является важнейшей задачей в области биомедицины, так как она дает возможность определить наличие или развитие генетических заболеваний на ранних стадиях.

Еще одной особенностью данной работы является то, что в качестве ДНК-проб, иммобилизованных на поверхности электрода, использовались не обычные ssДНК, а олигонуклеотиды в виде шпилек (hpДНК). Благодаря своему строению, такие олигонуклеотиды показали более высокую селективность при детекции однонуклеотидного полиморфизма, нежели линейные фрагменты ДНК.

Также одним из наиболее перспективных материалов для электрохимической детекции ДНК благодаря своим свойствам является графен. Например, в работе [9] была разработана эффективная платформа для импедансных ДНК-сенсоров, где N,N-ди-1-аминопропил-3-пропилимидазол перилена-3,4,9,10-тетракарбоновой кислоты (PDI) был прикреплен к поверхности графенового листа, который использовался в качестве сенсорной поверхности. Электростатические взаимодействия между положительно заряженными кольцами имидазола в PDI и отрицательно заряженным фосфатным скелетом одноцепочечной ДНК облегчают иммобилизацию ssДНК, частично оставляя азотистые основания свободными для эффективной гибридизации (рис. 3). Иммобилизация и гибридизация ДНК приводят к изменению межфазных свойств PDI/графена, которые контролируются с помощью электрохимической импедансной спектроскопии и используются в качестве аналитического сигнала. При этом исследования продемонстрировали, что данный сенсор способен не только отличить комплементарную последовательность от некомплементарной, но и показывает изменение R_{ct} в 30% при использовании цепочек ДНК с 2 или 4 ошибочно спаренными нуклеотидами.

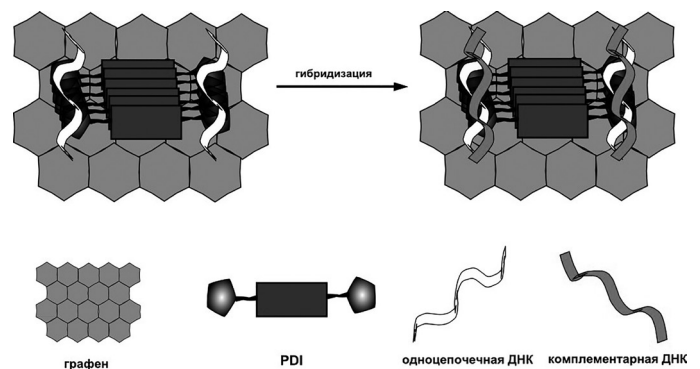


Рис. 3. Схематическая презентация гибридизации ДНК на поверхности PDI/графеновой платформы

В последние годы среди всех материалов на основе углерода привлек к себе оксид графена. Поэтому и в области геносенсоров на него обращено пристальное внимание исследователей. Сразу в нескольких работах в 2014 году [22, 23] устанавливаются преимущества

модифицированных различными наночастицами сенсоров для определения гибридизации ДНК на основе оксида графена. Преимуществами данных платформ перед остальными являются широкий диапазон определяемых концентраций вместе с низким пределом обнаружения ДНК.

Таким образом, несмотря на разнообразие материалов, использующихся в качестве платформы для импедансометрической детекции ДНК (золото, платина, кремний, оксид алюминия), в последние годы большое внимание уделяется материалам на основе углерода, которые считаются наиболее перспективными для дальнейшего совершенствования ДНК-биосенсоров на основе процесса гибридизации.

Детекция взаимодействий лигандов с ДНК посредством электрохимической импедансной спектроскопии

Известно, что применение ДНК-биосенсоров не ограничивается лишь определением последовательности целевой ДНК. Некоторые исследования уже показали, что биосенсоры, основанные на иммобилизованной ДНК, способны к определению некоторых высоко- и низкомолекулярных соединений. Существует несколько методов, способных выполнять подобный анализ, но наиболее перспективно выглядят электрохимические методы благодаря своей низкой стоимости, простоте выполнения, быстрому получению сигнала и способности к миниатюризации. В работе [19] представлена импедансометрическая система для детекции взаимодействий ДНК-лиганд, которая состоит из тиол-модифицированной ss-ДНК, хемосорбированной на золоте. В данной работе было использовано три разных соединения, способных к взаимодействию с ДНК.

Спермин — алифатическое поликатионное соединение, которое найдено во всех клетках и играет специфическую роль в регуляции пролиферации клеток. Оно соединяется с канавками ДНК с помощью электрохимических взаимодействий между отрицательно заряженным фосфатным скелетом и положительно заряженными аминогруппами. Анализ данных показал, что уменьшение сопротивления переносу заряда после часовой инкубации электродов в растворе спермина составляет 20%, в то время как емкость возрастает на 2%. Если сравнивать этот метод с ранее описанным в литературе [4] вольтамперометрическим подходом к обнаружению спермина за счет оценки окисления гуанина, то импедансометрический метод демонстрирует немного меньшую

чувствительность, но позволяет увидеть зависимость сигнала от концентрации и дает возможность проводить дополнительные повторяемые измерения.

Обнаружение интеркаляции (обратимое включение молекулы или группы между другими молекулами или группами) в двухцепочечной ДНК (dsДНК) исследовалось с помощью комплекса рутения (II) ($[Ru(phen)_3]^{2+}$). Импедансные спектры, полученные после инкубации электродов с двухцепочечной ДНК, показали, что снижение полученного R_{ct} составляет примерно 17%. Емкость же увеличилась примерно на 2,5% после инкубации.

В заключительной части статьи рассматривается специфическое связывание белка и dsДНК с помощью антител к ДНК-дуплексу. Золотые электроды, модифицированные dsДНК и ssДНК, подвергались воздействию раствора антитела и показали различные результаты после инкубации. Отчетливое снижение импеданса можно наблюдать после воздействия антител на dsДНК. Анализируя импедансный спектр, можно сказать, что сопротивление электронного переноса уменьшилось на 12%, тогда как емкость увеличилась только на 1%. Электроды с ssДНК же продемонстрировали увеличение R_{ct} примерно на 3%.

Таким образом, в рассмотренной работе представлена безметочная система для детекции связывания ДНК с низко- и высокомолекулярными соединениями. Во всех случаях сигнальным параметром является сопротивление переносу заряда, в то время как емкость демонстрирует лишь небольшие изменения при связывании. Кроме того, установлено, что импедансометрический сигнал при распознавании комплементарных цепей зависит от плотности покрытия зонда. Плотность около 15 пмоль/см² показывает 4,5-кратное увеличение R_{ct} после гибридизации, что позволяет проводить более чувствительное безметочное определение ДНК.

Сенсоры на основе одноцепочечной ДНК пригодны и для определения взаимодействий ДНК-белок. Как показано в работе [18], электрохимическую импедансную спектроскопию можно использовать для безметочной детекции специфического распознавания последовательностей ДНК молекулами белков. В этом опыте изучалось последовательно-специфическое расщепление иммобилизованной двойной спирали ДНК (dsДНК) рестриктазой второго типа BamHI. Сначала расщепление ДНК изучалось вольтамперометрически в присутствии метиленового синего. На циклической вольтамперограмме в присутствии метиленового синего наблюдается окислительно-восстановительный пик, а

после 3-часового выдерживания электрода в растворе VamHI этот пик пропадает, что связано с тем, что во время взаимодействия VamHI с dsDNA происходит расщепление последовательности ДНК и метиленовый синий уходит с поверхности электрода.

После этого для изучения расщепления последовательности ДНК без использования каких-либо меток применялся метод ЭИС, и значение сопротивления электронному переносу на dsDNA модифицированных электродах уменьшилось с 2994 Ом до 1005 Ом после выдерживания в растворе VamHI в течение 3 часов.

Таким образом, в данных работах показано, что возможность мониторинга изменений электрических свойств поверхности сенсора с помощью импедансной спектроскопии имеет потенциал для создания простого, быстрого и недорогого метода анализа. Кроме того, метод электрохимической импедансной спектроскопии лишен одного серьезного недостатка, присутствующего у амперометрических и вольтамперометрических методов детекции: необходимости приложения напряжения и пропускания электрического тока.

Электрохимическое секвенирование ДНК и возможность использования ЭИС в методах секвенирования ДНК нового поколения

Традиционным способом секвенирования ДНК являются флуоресцентные технологии. В последнее время в дополнение к ним появляются менее дорогие и быстрые методы безметочного электрохимического секвенирования, которые называют методами секвенирования «нового поколения». Основным отличием этих методов является возможность параллельного и одновременного секвенирования нескольких участков генома. В обзорах [1, 13] рассматриваются разработанные в последнее время методы секвенирования «нового поколения». Главными преимуществами этих методов считается значительное сокращение времени определения и минимальные затраты на дополнительное оборудование по сравнению с традиционными методами секвенирования. Фактически такие проекты по секвенированию генома, которые по методу Сэнгера заняли бы несколько лет, могут быть закончены с помощью методов нового поколения за несколько недель. Лимитирующим же фактором новой технологии стала все еще достаточно высокая цена за секвенирование с очень высокой пропускной способностью, пусть даже цена за секвенирование одного участка по сравнению с методом Сэнгера уменьшилась на несколько порядков. Еще одной проблемой является проблема уменьшения

количества ошибок при секвенировании, причем метод Сэнгера по этому показателю даже превосходит методы нового поколения. Кроме того, огромные объемы данных, получаемые при секвенировании, требуют более эффективного программного обеспечения и компьютерных алгоритмов обработки.

Авторы обзоров считают, что методы секвенирования нового поколения будут иметь широкое применение в биологии и медицине. Снижение стоимости секвенирования ДНК позволило поставить цель в достижении стоимости расшифровки генома человека в \$1000. Высокая пропускная способность методов секвенирования нового поколения сделала возможным анализ сложных образцов, содержащих смесь большого количества нуклеиновых кислот, путем секвенирования одновременно всего содержания образца. К тому же методы секвенирования нового поколения могут быть применены для характеристики мРНК, метилированной ДНК, участков ДНК и РНК, связанных с определенными белками, и других участков ДНК и РНК, вовлеченных в экспрессию и регуляцию генов.

Одной из разновидностей электрохимического секвенирования является полупроводниковое секвенирование. Секвенаторы, основанные на этом принципе, разработаны фирмой Ion Torrent. Ion Torrent используют технологию «секвенирования с помощью синтеза» (sequencing-by-synthesis, SBS). Встраивание комплементарного нуклеотида в одноцепочечную ДНК при работе ДНК-полимеразы сопровождается выделением иона водорода в раствор, что фиксируется рН-чувствительными сенсорами. В сущности, Ion Torrent-чип представляет собой очень чувствительный рН-метр. Каждый чип содержит миллионы ион-чувствительных полупроводниковых транзисторных сенсоров, позволяющих осуществлять параллельную детекцию множества секвенирующих реакций [17].

Увеличение концентрации ионов водорода, выделяющихся в процессе встраивания комплементарных нуклеотидов в ssDNA , можно обнаруживать как по изменению рН, так и по изменению электропроводности раствора. Учитывая, что ионы водорода достаточно быстро диффундируют из лунок ДНК чипа, изменение электропроводности можно фиксировать, измеряя электропроводность раствора над лунками. Если в пространство ячейки над лунками вмонтировать 2 параллельно расположенных Pt-электрода и определить постоянную ячейки, то измеряя импеданс ячейки на высоких частотах в интервале (100–1000 Гц) можно определять изменение электропроводности при последовательном прокачи-

вании растворов, содержащих один из 4 нуклеотидов. Присутствие в растворе комплементарного нуклеотида должно сопровождаться ростом электропроводности раствора. Электропроводность можно определить с помощью электрохимической импедансной спектроскопии из измерений импеданса по величине R_s . Понятно, что в данном случае нельзя использовать буферные растворы, на фоне которых (из-за высокой электропроводности) не будет чувствоваться изменение электропроводности. Поэтому измерения нужно проводить в максимально разбавленных безбуферных растворах. При этом нужно обеспечивать постоянство электропроводности раствора в присутствии некомплемментарных нуклеотидов.

Заключение

В представленном обзоре мы рассмотрели развитие импедансометрических ДНК-биосенсоров и возможность их применения для решения различных задач. Можно сказать, что область импедансометрических ДНК-биосенсоров в настоящее время активно развивается и в литературе описано множество решений для нахождения требуемых свойств импедансометрических биосенсоров. В биосенсорных системах используются различные варианты импедансометрических измерений, включая нефарадеевское измерение емкости, фарадеевскую импедансную спектроскопию в присутствии внешнего редокс-реактанта или измерения с использованием полевых транзисторов. Показано, что электрохимическая импедансная спектроскопия не только является достаточно чувствительным методом для детекции образования двухцепочечной ДНК, но и может использоваться для регистрации однонуклеотидного полиморфизма или взаимодействия молекулы ДНК с различными лигандами.

Импедансометрические измерения могут широко применяться в различных областях — от медицинских анализов до контроля окружающей среды. Методы импеданса уже успешно применены к электродам, модифицированным различными биологическими материалами. Кроме того, методы ЭИС могут быть использованы для решения одной из важнейших задач современной генетики — разработки новых методов электрохимического секвенирования и снижения стоимости секвенирования ДНК.

Статья была написана при поддержке ФЦП «07-13», при выполнении работ по ГК 14.512.11.0087 от 20.06.2013 г. «Разработка основ биосенсорных технологий для создания новых устройств полупроводникового секвенирования ДНК».

Литература

1. *Ansorge W.J.* // *New Biotechnology.* — 2009. — Vol. 25. — P. 195–204.
2. *Bonanni A., del Valle M.* // *Analytica Chimica Acta.* — 2010. — Vol. 678. — P. 7–17.
3. *Bonanni A., Pividori M.I., del Valle M.* // *Analyst.* — 2010. — Vol. 135. — P. 1765–1772.
4. *Corduneanu O., Chiorcea-Paquim A.-M., Diculescu V., Fiuza S.M., Marques M., Oliveira-Brett A.M.* // *Analytical Chemistry.* — 2010. — Vol. 82. — P. 1245–1252.
5. *Daniels J.S.* *An Integrated Biosensor Array.* — Stanford University, 2010. — 240 p.
6. *Fayazfar H.* // *Analytica Chimica Acta.* — 2014. — Vol. 836. — P. 34–44.
7. *Feng Y., Yang T., Zhang W., Jiang C., Jiao. K.* // *Anal. Biochem.* — 2007. — Vol. 365. — P. 24–30.
8. *Henry O.Y.F., Acero Sanchez J.L., Latta D., O'Sullivan C.K.* // *Biosensors and Bioelectronics.* — 2009. — Vol. 24. — P. 2064–2070.
9. *Hu Y., Wang K., Zhang Q.* // *Biomaterials.* — 2012. — Vol. 33. — P. 1097–1106.
10. *Hwee Lin Poh, Bonanni A., Pumera M.* // *RSC Advances.* — 2012. — Vol. 2. — P. 1021–1024.
11. *Kafka J.* // *Electrochimica Acta.* — 2008. — Vol. 53. — P. 7467–7474.
12. *Labuda J., Brett A.M.O.* // *Pure Appl. Chem.* — 2010. — Vol. 82. — No. 5. — P. 1161–1187.
13. *Mardis R.E.* // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* — 2008. — Vol. 9. — P. 387–402.
14. *Ozsoz M.* *Electrochemical DNA biosensors.* — Pan Stanford, 2012. — 517 p.
15. *Palecek E.* *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins: Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics.* — Elsevier, Amsterdam, 2005. — P. 74–174.
16. *Peng H., Soeller C., Cannell M.B., Bowmaker G.A., Cooney R.P., Travas-Sejdic J.* // *Biosens. Bioelectron.* — 2006. — Vol. 21. — P. 1727–1736.
17. *Rothberg J.M., Hinz W., Rearick T.M.* // *Nature.* — 2011. — Vol. 475. — P. 348–352.
18. *Tersch C., Lisdat F.* // *Electrochimica Acta.* — 2011. — Vol. 56. — P. 7673–7679.
19. *Witte C., Lisdat F.* // *Electroanalysis.* — 2011. — Vol. 23. — P. 339–346.
20. *Xin R. Cheng, Ben Y.H. Hau* // *Biosensors and Bioelectronics.* — 2014. — Vol. 53. — P. 513–518.
21. *Xu Ying, Jiang Ying, Cai Hong* // *Analytica Chimica Acta.* — 2004. — Vol. 516. — P. 19–27.
22. *Yola M.L., Eren T.* // *Electrochimica Acta.* — 2014. — Vol. 125. — P. 38–47.
23. *Zhang Z., Luo L.* // *Biosensors and Bioelectronics.* — 2014. — Vol. 60. — P. 161–166.

IMPEDANCE SPECTROSCOPY IN MODERN ELECTROCHEMICAL DNA BIOSENSORS

S.E. TARASOV¹, V.V. EMETS², M.A. GUTOROV³, A.N. RESHETILOV¹

¹ *G.K. Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS,
Pushchino, Moscow Region;*

² *A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry RAS, Moscow;*

³ *Gamma Ltd., Moscow, Zelenograd*

The review presents some modern approaches to registering electrochemical processes associated with DNA (hybridization interaction with ligands polymorphism). Treated as described in the literature DNA biosensors based on electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and the possibility of using EIS in new generation methods of DNA sequencing.

Keywords: impedance, single-stranded DNA, hybridization, genosensor, DNA biosensor, electrochemical impedance spectroscopy, electrochemical sequencing.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ ИСКУССТВЕННОГО МЯСА ПО ТЕХНОЛОГИИ IN VITRO

Ю.А. ИВАНОВ*, Г.К. ТОЛОКОННИКОВ, Е.Б. ПЕТРОВ, В.Ю. СИДОРОВА

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт механизации животноводства», Москва

В обзоре рассматривается возможность использования мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК) и миосателлитов для выращивания искусственного мяса in vitro. На сегодняшний день исследования по получению ММСК крупного рогатого скота, выделение их из костного мозга (КМ), жировой ткани и миосателлитов проводятся только в Секторе стволовой клетки ГБНУ ВИЭВ. Имеются сообщения зарубежных авторов о выделении ММСК из КМ крупного рогатого скота, из КМ свиньи, а также миосателлитов для нужд ветеринарии, вирусологии и пищевой промышленности, что является новым перспективным направлением.

Ключевые слова: ММСК, миосателлиты, этапы культивирования стволовых клеток, искусственное мясо, перспективный источник белка, альтернативный метод.

Введение

Развитие современного мира в контексте постоянно растущей численности населения требует решения сложной задачи — увеличения продуктов питания. Рост объемов производства мяса и связанные с этим проблемы животноводства в глобальном масштабе будут все глубже обострять сопряженные процессы, к которым относятся неэффективное использование энергетических и трудовых ресурсов; возрастает негативная нагрузка на окружающую среду.

Выращивание скота для удовлетворения потребностей в продуктах питания всегда было неотъемлемой частью существования человека, а результаты до последнего времени экономически и социально положительными. Однако рост народонаселения планеты требует увеличения производства продуктов питания, а современные методы производства становятся все более чувствительными к условиям соблюдения безопасности окружающей среды. Неблагоприятное влияние животноводства на окружающую среду может быть прямым,

как, например, выделение метана жвачными животными и продуктами их жизнедеятельности, или косвенным — расширение посевных площадей под возделывание кормовых культур ведет к уничтожению растительных массивов, например, за счет вырубания лесов.

Результаты исследований, проведенных по заказу организации New Harvest, показали, что в сравнении с традиционно выращенным мясом для производства 1000 кг культурального мяса потребуется 26–33 ГДж энергии, или меньше на 7–45%, 367–521 м³ воды, или меньше на 82–96%, 190–230 м² земли, или меньше на 99%, а выбросы парниковых газов составят 1900–2240 кг в СО₂-экв, или меньше на 78–96%. Как мы видим, эффективность производства культурального мяса намного выше, чем традиционно произведенного.

Для получения культурального мяса расходы землепользования минимальны, поэтому больше земли может использоваться для получения и производства биоэнергии. Выбросы парниковых газов, имеющие место при традиционном животноводстве, связанном с использованием топлива и электроэнергии, при производстве культурального мяса могут быть значительно сокращены при помощи возобновляемых или альтернативных источников. При разведении скота потенциал для сокращения выбросов парниковых газов ограничен, так как выбросы в основном обусловлены последствиями жизнедеятельности животных: выделением метана из навоза, закиси азота из почвы и т.д.

© 2014 г. Иванов Ю.А., Толоконников Г.К., Петров Е.Б., Сидорова В.Ю.

* **Автор для переписки:**

Иванов Юрий Анатольевич,

д.с.-х.н., профессор, чл.-корр. РАСХН

директор ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт механизации животноводства», Москва

E-mail: vniimzh@mail.ru

Предпосылки создания искусственного мяса

Мясо из пробирки, или искусственное мясо, — это мясо, которое никогда не было частью животного. Потенциально мышечную ткань любого животного можно выращивать в пробирке (*in vitro*). Мясо из пробирки не следует путать с имитацией мяса, произведенного из растительного белка, чаще всего из соевого или пшеничного (вегетарианское мясо).

В 2000 году американские ученые под руководством М.А. Бенжаминсона [8] предприняли попытки создать систему производства искусственного белка мышечной ткани золотой рыбки (*Carassius auratus*) в чашке Петри *in vitro* для долгосрочного питания космонавтов. Для этого эксплантаты мышечной ткани помещали в различные культуральные среды и культивировали в течение 7 дней, причем наблюдали увеличение эксплантатов в пределах от 5,2 до 13,8% площади поверхности. При помещении эксплантатов в среду, содержащую отдельные клетки мышечной ткани золотой рыбки, и площадь их поверхности увеличилась еще на 79%. Для употребления полученные культивированные эксплантаты промывали, смачивали в оливковом масле со специями, запанировывали в сухарях и обжаривали.

В 2004 году была образована некоммерческая научно-исследовательская организация New Harvest (<http://www.new-harvest.org>). Целью этой организации стала поддержка развития исследований по созданию заменителей мяса с долгосрочной перспективой получения экономически выгодной и конкурентоспособной альтернативы традиционному производству мяса и мясopодуктов. Сайт организации до сих пор служит форумом для обмена техническими инновациями, публикациями, новостями по этому вопросу.

В 2005 году доктор Виллем ван Элен (Willem van Eelen) убедил голландское правительство поддержать его исследования в сфере получения мяса из пробирки. Была проведена серия экспериментов. Первое исследование дало ответ на вопрос, каким образом эмбриональная стволовая клетка превращается в мышечную. Цель второго исследования состояла в том, чтобы узнать, как заставить мышцы расти. Третий эксперимент объяснял, какое средство лучше всего использовать для стимулирования роста мяса в лаборатории.

Результаты экспериментов, проводившихся с октября 2011 года по июнь 2013 года в рамках программы Cultured Beef («Выращивание мяса в пробирке») в Маастрихтском университете Голландии, главой фа-

культета сердечно-сосудистой физиологии, профессором Марком Постом (Mark Post) и его коллегами были представлены в Лондоне в виде квадратной котлеты из культурального мяса. Кусок синтетического мяса был выращен из клеток, взятых в лопаточной части коровы, которые выросли в кусочки мяса; всего около 20 тысяч волокон 143 граммов веса были превращены в фарш, а затем — в котлету. В результате при создании котлеты не было убито ни одно животное. Для выращивания мышечной ткани профессор Марк Пост брал не эмбриональные клетки, развитие которых может быть непредсказуемым, а миосателлиты — стволовые клетки, присутствующие в мышцах млекопитающих и становящиеся мышечной тканью в результате интенсивных физических нагрузок [15].

Предпосылки для получения искусственного мяса создавались десятилетиями. Профессор Алексис Каррель в 1912 году одним из первых смог сохранить кусочек куриной сердечной мышцы живой и бьющейся на чашке Петри. В 1950-х годах врач Виллем Фредерик ван Эйлен (Амстердам, Нидерланды) независимо от других исследователей нашел способ использования культуры ткани для производства мясных продуктов.

В настоящее время можно выделить порядка 9 групп ученых в мире, работающих над проблемой создания культурального мяса. Наибольших успехов добились ученые из Нидерландов. Они активно публикуют свои исследования, как в научной литературе, так и в научно-популярных изданиях, проводят презентации своих разработок на телевидении, в Интернете. В Нидерландах очень сильна финансовая поддержка проекта правительством. В 2005 году на научные разработки в этой области здесь было выделено около €2000000. В США на сегодняшний день основные исследования по этому вопросу ведутся под руководством профессора В.А. Миронова из медицинского университета в Южной Каролине и профессора МакФарланда из Университета Южной Дакоты.

В своих работах профессор Эдельман с коллегами из университетов США, Хенк Хаагсман [13] из Университета Утрехта, Марло Люсия Петронела Лангелаан и др. дали положительную характеристику различным типам клеток, условиям культивирования. Таким образом, возможности использования стволовых клеток (эмбриональных, мезенхимных, сателлитных) для культивирования на различных типах матриц, в биореакторах с искусственной средой выращивания *in vitro* были признаны перспективными для дальнейшего направленного выращивания искусственного мяса.

Фенотипический потенциал стволовых клеток

Эмбриональные стволовые клетки имеют высокий потенциал к делению и самовоспроизведению, при индукции и дальнейшей дифференцировке могут образовывать *in vitro* клетки любых тканей. Но получить их можно только в специфических случаях — из абортивного материала, при выкидышах, из пуповинной крови новорожденных и т.д.; поэтому здесь следует учитывать в полной мере этические вопросы использования этого типа клеток.

Американец Джон Вейн получил патент США на производство мяса *in vitro* [16]. Он предлагал выращивать эмбриональные или мезенхимные стволовые клетки млекопитающих на подложке из натуральных биоматериалов, далее индуцировать их в миобласты или собственные стволовые клетки мышечной ткани. Миобласты могут дифференцироваться в миоциты, фибробласты или в другие клетки мышечной ткани под действием специфичных ростовых факторов или индукторов. В описании патента, помимо получения клеток мышечной ткани, приводилась возможность получения клеток жировой, костной и хрящевой тканей *in vitro*.

Первые исследования, проведенные в России под руководством академика РАСХН Иосифа Александровича Рогова [2, 3, 4], позволили предложить оригинальный способ накопления клеток мышечной ткани с использованием отечественных разработок. Авторы нашли способ получения мясного продукта, включающий в себя выделение мышечных мезенхимных клеток сельскохозяйственных животных, с посевом их на поддерживающий каркас. Изобретение позволяет получать пищевой продукт, состоящий из скелетных миобластов и фибробластов. На сегодняшний день методами клеточной биотехнологии получена биомасса, состоящая из клеток мышечной ткани, выращенных путем направленной миодифференцировки мультипотентных мезенхимных стволовых клеток крупного рогатого скота (ММСК КРС) *in vitro*.

Основным источником мультипотентных мезенхимных стволовых клеток является костный мозг (КМ). Кроме того, они обнаружены в жировой ткани (ЖТ) и ряде других тканей с хорошим кровоснабжением. Существуют объективные доказательства того, что естественная тканевая ниша мезенхимных стволовых клеток расположена периваскулярно — вокруг кровеносных сосудов. Кроме того, мезенхимные стволовые клетки обнаружены в пульпе молочных зубов, амниотической (околоплодной) жидкости, пуповинной крови и вар-

тоновом студне (пупочном канатике). Эти источники принимаются во внимание, но редко применяются на практике, так как, например, выделение молодых стромальных клеток из вартонова студня представляет собой крайне трудоемкий процесс.

В 2005–2006 годах специалисты по мезенхимным клеточным структурам официально определили ряд параметров, которым должны соответствовать клетки, относящиеся к этой популяции [10–12, 14]. Опубликованные статьи излагали вопросы ортодоксальных иммунофенотипов мезенхимных клеток и направлений их дифференцировки. К ним, в частности, отнесли направленную дифференцировку в клетки костной, жировой, хрящевой, мышечной, нервной или другой ткани *in vitro*. Между тем ряд проведенных экспериментов по дифференцировке мезенхимных клеток в нейроноподобные *in vitro* не позволил точно установить, являются ли полученные клетки функциональными нейронами, или это глиальные элементы. Более успешно эксперименты проводились в области дифференцировки стромальных клеток в миоциты — клетки мышечной ткани и другие типы клеток паренхимы *in vitro*.

Открытие мультипотентных мезенхимных стволовых клеток костного мозга восходит к началу XX века к А.А. Максиму, а разработка данной проблемы принадлежит Александру Фриденштейну и относится к 1960-м годам [7]. Группой А. Фриденштейна было показано, что после пересадки КМ под почечную капсулу мыши формируется костная ткань, заселенная кроветворными клетками. При помещении клеток КМ в диффузионную камеру клетки также формировали костную ткань, но заселения клетками крови не происходило. Благодаря полученным результатам был сделан вывод об остеогенном потенциале клеток КМ, в отличие, например, от клеток эпителия, а также подтверждено, что остеогенные предшественники костного мозга отличаются от предшественников клеток крови.

Культивирование клеток КМ при низкой плотности посева позволяет обнаруживать колониеобразующие единицы фибробластов (КОЕф), являющиеся наиболее ранними представителями пула стромальных клеток. С использованием лимитирующего разведения и посева в диапазоне 3000–30000 ядродержащих клеток/см² наблюдалось формирование отдельных фибробластных колоний, частота встречаемости которых в первичной культуре была 2–3 на 100000 ядродержащих клеток. В этих условиях культивирования формировались колонии трех типов, различающиеся по размеру и характеру упаковки клеток. Крупными считали колонии, в состав ко-

торых входило более 500 фибробластоподобных клеток, плотно упакованных в центре колонии, средние колонии (от 100 до 500 клеток) имели разреженное расположение клеток, мелкие содержали до 100 рыхло расположенных клеток. Известно, что различия в морфологии колоний указывают на разнокачественность КОЕф в пределах одной популяции стромальных клеток.

Стромальные клетки-предшественники человека обладают высокими адгезивными свойствами — 90% этих клеток прикрепляются к подложке дна культурального флакона за первые 30–60 мин. после эксплантации. А. Фриденштейн выявил две категории остеогенных клеток-предшественников: детерминированные (в костном мозге) и индуцибельные (в мезенхимной строме внутренних органов и подкожной соединительной ткани). В дальнейшем было показано, что стромальные клетки КМ не теряли своего остеогенного потенциала при длительном культивировании. Проходя около 50 удвоений численности, эти клетки сохраняли диплоидность. Хотя первоначально ММСК были обнаружены в КМ взрослых доноров, в дальнейшем они были выделены и из других источников: подкожно-жировой клетчатки, крови, пренатального костного мозга, печени и селезенки. Следует заметить, что наиболее интенсивно эти исследования проводятся на культуральных тканевых образцах человека и грызунов.

Наряду с эмбриональными клетками ММСК в виде клеток ЖТ и КМ, развитие которых зачастую непредсказуемо, для выращивания мышечной ткани используются унипотентные клетки собственно мышечной ткани — миосателлиты. Миосателлиты — моноядерные миогенные стволовые клетки, располагаются между базальной мембраной и клеточной мембраной (сарколеммой) скелетного мышечного волокна и являются главными участниками постнатального мышечного роста.

Становится очевидным, что мультипотентные мезенхимные стволовые клетки — это уникальные клеточные популяции, способные к самовозобновлению и дифференцировке в различные клеточные типы. В отличие от других клеток организма, выполняющих строго определенные функции, СК, в том числе КМ, ЖТ, миосателлиты, в обычных условиях остаются недифференцированными и получают возможность дифференцироваться в специализированные клетки в ходе развития. Из стволовой клетки могут возникнуть кожные, мышечные, нервные, клетки крови и др., которые теряют возможность делиться во взрослом организме. Такие стволовые клетки имеют высокий пролиферативный потенциал, что способствует их выращиванию в искусственной среде.

Условия культивирования стволовых клеток

Стволовые клетки — ЖТ, КМ, миосателлитные клетки, находятся непосредственно в мышечной ткани и запрограммированы на направленную дифференцировку только в клетки мышечной ткани. У данного типа клеток высокий пролиферативный потенциал, хотя они способны дифференцироваться только в один тип клеток. Важным преимуществом стволовых клеток-предшественников этого типа является то, что производить их забор в необходимых количествах можно из образцов периферической крови сельскохозяйственных животных, без убоя.

Использование гормонов и антибиотиков в сельском хозяйстве приводит к тому, что они частично остаются в мясе и молоке животных. При использовании культурального мяса, выращиваемого без использования антибиотиков, риск аллергических заболеваний и нарушения иммунитета снижается.

Среды культивирования стволовых клеток применяются как с использованием сыворотки крови: а) от 0,1% до 90 вес. % сыворотки; б) от 0,1% до 10000 МЕ/мл гепарина; в) от 0,1% до 10000 МЕ/мл протамина (глутамин), так и бессывороточные. Для культивирования могут быть использованы практически любые среды, содержащие необходимый набор питательных элементов, но существуют доступные промышленные серийно выпускаемые среды: МЕМ (Minimum Essential Medium), Игла в модификации Дульбекко (DMEM), F-12, DMEM в модификации Искова (IMDM), RPMI, 199, Грейса, Шнайфера, CO₂-независимые среды, среды для заморозки клеток Recovery™, среды Opti-MEM® I, среды для нейрональных клеток и др., а также питательные добавки к средам: глутамин стерильный, НАТ-50-кратный стерильный, НТ-50-кратный стерильный, инсулин бычий, колхицин и др. К бессывороточным средам относятся среды DMEM/F-12, GiVco, CD CHO без L-глутамин, AIM V с BSA с L-глутамином, среда CD OptiCHO™ без L-глутамин и др.

Очистка полученных стволовых клеток-предшественников проводится любым из традиционных способов. В частности, очистка стволовых клеток-предшественников включает в себя иммуноочистку путем использования специфических и селективных антител, например, антител к CD56 (CD56 представляет собой внеклеточный антиген, характерный для скелетных мышц). В отсутствие специфического антигена гемопоэтические клетки CD45, показывающие фенотип CD56+ /CD45-, дают возможность идентификации для

возможной очистки стволовых клеток-предшественников на основе характерных внеклеточных антигенов.

Стволовые клетки-предшественники для заселения и хранения могут быть получены путем биопсии, в частности, биопсии скелетных мышц. Образец, извлеченный путем мышечной биопсии, содержит различные типы тканей: адипоциты, фибробласты, предшественники мезенхимы, гемопоэтические клетки, мышечные волокна, ткань сосудов (эндотелий, гладкие мышцы) и, безусловно, миобласты и клетки-сателлиты. Обычно исходное содержание стволовых клеток-предшественников в извлеченном путем биопсии образце скелетной мышцы, имеющих нужный фенотип аутологических стволовых клеток-предшественников, определяемый, например, как CD56+/CD45-, составляет менее 10% (<http://www.freepatent.ru/patents/2312141>).

Для получения композиций, обогащенных стволовыми клетками-предшественниками мышечных, не содержащих фибробластов, проводят очистку культивированных стволовых клеток-предшественников. В этом случае клеточная культура подвергается стадии предварительного посева, в результате которой фибробласты осаждаются быстрее, чем миобласты или клетки-сателлиты.

Подобным образом даже небольшая доля стволовых клеток, трудно поддающихся идентификации, воспроизводит сама себя и дифференцируется в клетки, экспрессирующие антиген — предшественник мышечных клеток CD56. Процесс дифференциации этого клеточного типа включает в себя этапы развития стволовой клетки в миобласт, затем — в незрелый миоцит, позднее — в зрелый миоцит и, наконец, — в мышечное волокно. Предшественниками мышечных клеток могут быть миобласты и миоциты (зрелые и незрелые), которые идентифицируются также на основе присутствия антигена CD56, интрацитоплазматической экспрессии десмина и отсутствия антигена CD45 (то есть, они показывают фенотип CD56+/десмин+/CD45-). Во время культивирования клеток происходит пролиферация клеток-сателлитов и миобластов, которые к этому времени превращаются в миоциты. Таким образом, после инкубации и развития клеток в среде культивирования накапливаются миобласты и миоциты (зрелые и незрелые).

Специфические и селективные антитела могут соединяться, в том числе с магнитными микросферами, и не только для очистки, но и для обогащения стволовых клеток-предшественников при помощи магнитного клеточного сепаратора. В этом случае клеточную культуру не подвергают стадии предварительного посева с целью

осаждения фибробластов перед проведением идентификации и выделением клеток-предшественников. Обогащение стволовых клеток-предшественников заключается в выявлении всех или части фибробластов, присутствующих в упомянутой клеточной культуре, а затем идентификации и выделении стволовых клеток-предшественников путем присоединения антител к CD56, соединенных как обычным способом с магнитными микросферами, так и в отдельную селекцию клеток, показывающих фенотип CD56+/CD45-.

В результате ферментативного расщепления мышечных волокон образуется клеточная суспензия, содержащая большое количество клеточных обломков. После перечисленных операций воздействия обломки клеток и волокон удаляют, а суспензия обогащается новыми стволовыми клетками-предшественниками. Таким образом, культивирование стволовых клеток-предшественников из скелетных мышц в среде культивирования в условиях, обеспечивающих возможность развития, включает в себя проведение ряда предварительных обычных процедур обработки: промывку, очистку, фильтрацию, обогащение, сбор клеток, например, путем осаждения, их идентификацию и при необходимости — хранение.

Установлено, что ММСК КРС, выделенные как из КМ, так и из ЖТ, способны формировать клетки жировой, костной и мышечной ткани при культивировании в индукционных средах *in vitro*. Клетки-сателлиты направленно формируют мышечную ткань. Полученная биомасса клеток мышечной ткани представляет интерес, прежде всего, как источник полноценного белка. Изучение состава белков полученной клеточной биомассы в сравнении с мышечной тканью традиционной говядины подтвердило их идентичность по аминокислотному и частично по фракционному составу.

Предполагаемое превосходство миосателлитов перед другими стволовыми клетками при создании иммортализованных линий для промышленного выращивания мяса в пробирке заключается в том, что именно они являются предшественниками миобластов, из которых в дальнейшем формируется мышечная ткань. Клетки-миосателлиты являются камбиальными элементами мышечных волокон и играют особую роль в процессах их физиологической и репаративной регенерации, они обладают выраженной антибактериальной, иммуностропной и репаративной активностью (<http://elibrary.ru/item.asp?id=18864305>). Костный мозг млекопитающих остается предпочтительным источником получения колониеобразующих единиц: число фибробластов костного мозга примерно в 6 раз превосходит по

этому признаку популяции других первичных культур, а эмбриональной печени — в 7,4 раза (<http://elibrary.ru/item.asp?id=1160217>).

Появление новых ядер в мышечном волокне (увеличение мышечной массы) может быть обеспечено только клетками-миосателлитами при их слиянии. Считается, что именно они обеспечивают мышечное волокно дополнительными ядерными структурами, необходимыми для роста в постнатальный период, а также при рабочей гипертрофии, и участвуют в восстановлении и локальной регенерации мышечных волокон после повреждения (<http://elibrary.ru/item.asp?id=15236122>, <http://elibrary.ru/item.asp?id=13043014>). Клетки-миосателлиты обладают особенно яркой реакцией пролиферации на факторы роста MGF и Pax7 и др., то есть могут начинать деление при их наличии, чего не наблюдается у ММСК. Таким образом, регенерация скелетных мышц зависит от камбиального резерва, формируемого клетками-миосателлитами. Культивация стволовых клеток требует обеспечения необходимой концентрации растворенного кислорода в жидкой фазе в течение всего процесса ферментации, причем потребность в нем культуры может меняться на разных фазах ее развития. Так, например, при большой плотности биомассы потребление кислорода может достигать 50 г/л. Обеспечить такой уровень содержания кислорода — достаточно сложная задача, так как растворимость кислорода в водной среде составляет всего лишь несколько миллиграммов на 1 л при давлении воздуха 0,1 МПа. Для создания высокой скорости газо- и массообмена, обеспечивающих интенсивный рост биомассы, необходимо организовать эффективное перемешивание дисперсной системы вода-воздух.

Заключение

В ходе современной научно-технической революции человек пытается решить проблему питания путем повышения эффективности растениеводства, животноводства, птицеводства и рыболовства, совершенствования существующей технологии переработки сырья и его более полного использования. Одним из новых направлений получения полноценного животного белка может стать мышечная ткань сельскохозяйственных животных, выращенная в биореакторах *in vitro*.

Развитие науки и практики биотехнологии в области культивирования клеток к началу XXI века достигло достаточно высокого уровня для того, чтобы идея создания культурального мяса стала очевидной почти одновременно для многих зарубежных (Нидерланды,

США, Австрия, Великобритания, Индия, Канада и др.) и российских исследователей.

Культуральное мясо — это искусственное мясо, выращенное *in vitro* с использованием технологий клеточной инженерии для исследований в области культур ствольных клеток. Стремительное развитие нанотехнологий создало новый подход для получения белоксодержащего продукта животного происхождения. Культуральное мясо не является альтернативой традиционному животноводству, оно создается как задел на будущее, новое перспективное направление на стыке многих наук.

Большое будущее отводится мезенхимным стволовым клеткам в связи с их основными свойствами и признаками. Среди проблем при использовании ствольных клеток для производства мяса в пробирке — риск неконтролируемой пролиферации и дифференцировки, контаминация, раковый вариант протекания культивирования.

В России работы по выделению стромальных клеток из тканей и органов сельскохозяйственных животных и определение условий их культивации только начинаются [1, 5, 6]. На сегодняшний день исследования по получению ММСК крупного рогатого скота, выделение их из КМ, ЖТ и миосателлитов проводятся только в Секторе стволовой клетки ГБНУ ВИЭВ. Имеются сообщения зарубежных авторов о выделении ММСК из КМ КРС, из КМ свиньи, а также миосателлитов для нужд ветеринарии, вирусологии и пищевой промышленности, что является новым перспективным направлением.

Литература

1. Волкова И.М., Викторова Е.В., Савченкова И.П., Гулюкин М.И. Характеристика мезенхимных ствольных клеток, выделенных из костного мозга и жировой ткани крупного рогатого скота // Сельскохозяйственная биология. — 2012. — № 2. — С. 32–38.
2. Патент 2314719 Российская Федерация МПК7 C12N 5/06, А 23 L 1/31. Способ получения мясного продукта / Рогов И. А., Валихов А. Ф., Демин Н. Я., Кроха Н. Г., Лисицын А. Б., Семёнов Г. В., Титов Е. И., Тутельян В. А., Рогов С. И., Эрнст Л. К.: заявитель и патентообладатель ФАО ГОУ ВПО Московский государственный университет прикладной биотехнологии. № 2006119540; заявл. 06.06.2006; бюл. №2.
3. Рогов И.А., Волкова И.М., Иванов Ю.А., Петров Е.Б., Толоконников Г.К., Черноиванов В.И. Перспективы использования ствольных клеток сельскохозяйственных животных в АПК / Биотехнология. Взгляд в будущее: Материалы 3-й Межд. науч. интернет-конф. Казань, 25–26 марта 2014 г. — Т. 2. — С. 72–79.

4. *Рогов И.А., Волкова И.М., Кулешов К.В., Савченкова И.П.* Дифференцировка мультипотентных мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга и жировой ткани крупного рогатого скота, в клетки мышечной ткани *in vitro* // *Сельскохозяйственная биология*. — 2012. — № 6. — С. 66–72.
5. *Сидорова В.Ю.* Принципы взаимосвязи сельскохозяйственной механизации и биотехнологии, или от ТЕХНО-к МИНИ- ЭКО-, БИО- и НАНО- агронаправлениям. // *Вестник ВНИИМЖ*. — 2014. — № 4(16). — С. 139–146.
6. *Тепляшин А.С., Чупикова Н.И., Коржикова С.В., Шарифуллина С.Э., Ростовская М.С., Топчиашвили Э.А., Савченкова И.П.* Сравнительный анализ двух клеточных популяций с фенотипом, подобным мезенхимным стволовым клеткам, выделенных из разных участков подкожно-жировой клетчатки // *Цитология*. — 2005. — № 7. — С. 637–643.
7. *Фриденштейн А.Я., Петракова К.В., Куралесова А.И., Фролова Г.П.* Клетки-предшественники для остеогенной и кроветворной тканей. Анализ гетеротропных трансплантатов костного мозга // *Цитология*. — 1968. — № 5. — С. 557–567.
8. *Benjaminson M.A.* In vitro edible muscle protein production system (MPPS): Stage 1, Fish // *Acta Astronautica*. — 2002. — Vol. 51. — No. 12. — P. 879–889.
9. *Bosch P., Pratt S.L., Stice S.L.* Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells // *Biology of Reproduction*. — 2006. — Vol. 74. — P. 46–57.
10. *Bosnakovski D., Mizuno M., Kim G., Ishiguro T. et al.* Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system // *Experimental Hematology*. — 2004. — Vol. 32. — P. 502–509.
11. *Colleoni S., Donofrio G., Lagutina I., Duchi R., Galli C., and Lazzari G.* Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells // *Cloning and Stem Cells*. — 2005. — Vol. 7. — No. 3. — P. 154–168.
12. *Da Silva M.L., Nardi N.B.* Murine marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion, and characterization // *British Journal of Hematology*. — 2003. — Vol. 123(4). — P. 702–711.
13. *Haagsman H.P., Hellingwerf K.J., Roelen B.A.J.* Production of animal proteins by cell systems. — Utrecht: Faculty of Veterinary Medicine, October 2009. — 58 p.
14. *Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Deans R.J., Krause D.S., Keating A.* Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy*. — 2005. — Vol. 7(5). — P. 393–395.
15. *Post M.J.* Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects // *Meat Science*. — 2012. — Vol. 92. — P. 297–301.
16. United States patent № US 7,270,829 B2. Industrial production of meat using cell culture methods / van Eelen W. F. 18 Sept. 2007.

PROSPECTS FOR THE USE OF STEM CELLS TO GROW ARTIFICIAL MEAT TECHNOLOGY IN VITRO

Y.A. IVANOV, G.K. TOLOKONNIKOV, E.B. PETROV, V.Y. SIDOROVA

All-Russia Research and Development Institute of Livestock Breeding Mechanization, Moscow

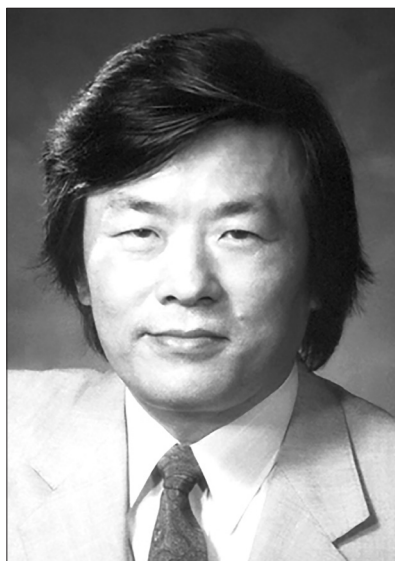
Report examines the use of multipotent mesenchymal stem cells (MMSC) and myosatellites for growing artificial meat in vitro. To date, research on obtaining MMSC cattle, their selection of bone marrow (BM), fat tissue and myosatellites conducted only in the sector of stem cell Y.R. Kovalenko All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine. There have been reports of foreign authors on the allocation of MMSC BM of cattle, BM of pigs, as well as for the needs of myosatellites veterinary virology and food industry, which is a new promising direction.

Keywords: MMSC, myosatellites, steps of culturing stem cells, artificial meat, promising source of protein, alternative method.

К 75-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ КРУПНОГО ИММУНОЛОГА И МОЛЕКУЛЯРНОГО БИОЛОГА СУСУМУ ТОНЕГАВЫ

О.В. ВОРОБЬЕВА*, В.С. ВОРОБЬЕВ, Р.Г. ВАСИЛОВ

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



В 2014 году исполняется 75 лет со дня рождения известного японского иммунолога, молекулярного биолога и нейробиолога, лауреата Нобелевской премии С. Тонегавы. На его долю выпало уникальное научное достижение — определение механизма, за счет которого осуществляется синтез огромного числа (десятки миллионов) антител, значительно превышающего возможности генетического материала В-клеток, ограниченного несколькими сотнями генов.

Биография. Сусуму (или Судзуми) Тонегава родился 6 сентября 1939 года в городе Нагоя (Япония). Благодаря довольно подробной автобиографии, приведенной в Нобелевских материалах [15], многие обстоятельства его личной и научной жизни хорошо известны (по крайней мере, до 1987 года, а после этого биографическая информация дается в кратких сводках и интервью) [13]. Его отец работал инженером в тек-

стильной компании, состоявшей из нескольких фабрик, расположенных на юге страны. В связи с этим отцу по долгу службы приходилось периодически менять место пребывания, и поэтому семья и маленькие дети хорошо познакомились с обстановкой провинциальной жизни.

У Сусуму было два брата и младшая сестра. По достижении школьного возраста он со старшим братом был отдан в престижную школу в Токио (Высшая школа Хибия). Уже с этого возраста проявил интерес к химии, что определило его поступление на кафедру химии Университета Киото в 1959 году. В конце университетского обучения Тонегава устроился в Институт вирусологических исследований при Университете Киото к профессору Ватанабе, который сумел убедить молодого исследователя в необходимости совершенствования в области молекулярной биологии в зарубежных университетах.

Затем его жизнь выстроилась в соответствии с традициями японской интеллигенции того времени — стажировкой и работой в ведущих иностранных университетах — главным образом США и Европы. Выбор пал на Калифорнийский университет в Сан-Диего, где он начал трудиться на кафедре биологии в лаборатории профессора Масаки Хайяши. Здесь он выполнил диссертацию, посвященную изучению транскрипционного контроля фага лямбда. Докторскую степень по молекулярной биологии он получил в 1968 году. В лаборатории Хайяши он состоял на должности постдокторанта до начала 1969 года, разрабатывая тему морфогенеза бактериофага фХ174.

Далее счастливая звезда повела молодого японского стажера по орбите экстраординарных свершений. Это случилось благодаря его переходу в лабораторию выдающегося молекулярного биолога XX века, лауреата Нобелевской премии Ренато Дzulбекко [4]. Для этого понадобилось лишь перейти через дорогу в Солковский институт, также входивший в состав Калифорнийского университета. При этом он оставался на той же должности «постдока».

Дzulбекко умел растить кадры, среди его учеников были четыре Нобелевских лауреата (включая Тонегаву)

© 2014 г. Воробьева О.В., Воробьев В.С., Василев Р.Г.

* Автор для переписки:

Воробьева Ольга Вадимовна

к.м.н.

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

E-mail: obr@biorosinfo.ru

[4]. Естественно, что тематика исследований была переориентирована на сферу научных интересов Дульбекко — выяснение роли вирусов в онкогенезе. Тонегаву должен был изучать транскрипты вируса SV40 при литической инфекции и в трансформированных клетках. Лабораторию отличала обстановка доброжелательности, взаимовыручки, подлинного научного братства, что впоследствии отмечал в своих воспоминаниях японский ученый.

Однако вскоре возникли непредвиденные обстоятельства, связанные с окончанием срока действия визы США в конце 1970 года в соответствии с условиями гранта Фулбрайта (Fulbright travel grant). Полагалось для возобновления визы делать перерыв пребывания в США. Молодой стажер подыскивал варианты. И опять сработал счастливый случай. Осенью 1970 г. Тонегаву получил авиапочтой письмо от Дульбекко, присланное из Рима. В нем руководитель лаборатории писал: «Дорогой Сузуми! Я не знаю, как Вы устраиваете свои дела после отъезда из Ла Джоллы в конце года, но мне хотелось бы упомянуть о другой возможности. Институт иммунологии в Базеле (Швейцария) начнет работать через месяц. Они уже собрали превосходных иммунологов, но еще не создали основу для молекулярной биологии. Я разговаривал о Вас с директором [института] Нильсом Йерне, и они заинтересованы в Вас... Имеется много иммунологически интересных данных, полученных с помощью грубо очищенных препаратов РНК, но они ненадежны, так как РНК не охарактеризована. В целом, это кажется наилучшей системой для развития понимания на молекулярном уровне, и Вы можете с удовольствием войти в такую область. Если Вам интересно, то напишите Нильсу К. Йерне: Базельский Институт иммунологии, Grenzacherstrasse, 487...» [21].

Несмотря на отсутствие опыта в области иммунологии Тонегаву принял предложение Дульбекко зимой 1971 года. Первый год пребывания в Швейцарии был нелегким. Он продолжил исследования вируса SV40, однако чувствовал себя в некоторой изоляции. Постепенно он начал входить в решение иммунологических проблем. Этому способствовали полезные контакты с иммунологом доктором Итой Асконас и генетиком Чарльзом Стейнбергом. Фактически Тонегаву стартовал с нуля в сфере иммунологических исследований.

Однако постепенно ему удалось объединить вокруг себя в качестве PI (principal investigator), то есть руководителя проекта, ряд технических специалистов и постдокторантов. Активную позицию занимал и Ч. Стейнберг. Появились некоторые идеи для разработки, особенно в связи с владением методами молекулярной биологии

— рекомбинантной ДНК и ферментами рестрикции. К 1974 году была определена линия исследования в плане генетических основ разнообразия антител. Сказывалась и благотворная обстановка Базельского института и поддержка директора Нильса Йерне [2]. Хотя и этот период не был лишен элементов драматизма. Тонегаву был уволен из института, но продолжал ходить в него и работать без денег. К тому же была просрочена виза и возникла угроза депортации. Но тем не менее история имела счастливый конец: через два месяца директор взял японского сотрудника обратно. Напряженная работа в течение 7 лет, вплоть до 1981 года, времени отъезда из Швейцарии обратно в США дала высокий результат — определение механизма соматической генерации иммунного разнообразия посредством рекомбинации унаследованных сегментов гена и соматических мутаций, за что в 1987 году он был удостоен Нобелевской премии.

В 1981 году Тонегаву был приглашен директором Центра по исследованию рака при Массачусетском технологическом институте (МИТ) Сальвадором Луриа (лауреатом Нобелевской премии 1969 года) [3] возглавить лабораторию и получить должность профессора биологии, что было с благодарностью принято.

Примерно в это же время ученый развелся с первой женой Киокой (у них было трое детей) и женился на Майуми Йошинами. Один из его сыновей от второго брака Сатто покончил жизнь самоубийством в возрасте 18 лет в 2011 году.

Работа в институте Луриа потребовала изменения тематики и перехода в область исследования памяти и обучения.

В 1994 году Тонегаву стал директором созданного им Пиковеровского института обучения и памяти. Этот пост он занимал до 2006 года, пока не был вынужден покинуть его добровольно (подать в отставку) в связи со скандальной историей с русской исследовательницей Аллой Карповой, которой он отказал в стажировке. Мотивы своего поступка он изложил в электронном письме, где указал на то, что чувствует дискомфорт в связи с появлением в институте молодого специалиста, область исследования которого пересекается с его собственными научными интересами. Комиссия сочла такую аргументацию неэтичной, что привело к отставке.

После этого — директор Медицинского института Говарда Хьюза. Возглавляет RICKEN-MIT Center for Neural Circuit Genetics и RICKEN Brain Science Institute [14].

Научный вклад. Открытие Тонегавы относится к одному из базовых в иммунологии. В XX

веке было присуждено 13 Нобелевских премий за иммунологические исследования, то есть в среднем премия раз в 5 лет (регулярность цикла нарушали две мировые войны). И среди них навечно записано его имя. Причем, ни в какой другой области медицинских и биологических знаний открытия не были так строго персонифицированы и не были привязаны к отдельной личности, как в иммунологии (примеров достаточно: первая Нобелевская премия — Беринг, дальше парад величайших имен — Кох, Эрлих, Мечников, Рише, Борде, Бернет, Йерне и т.д.).

Важно отметить факт быстрого признания важности, достоверности и значимости открытия японского ученого. По сути они были оценены сразу, с листа или, как принято сейчас говорить, онлайн. Соответственно и время закрепило незыблемость обнаруженных фактов и определило их историческое место.

Конечно, существенен и временной контекст открытия Тонегавы. Только что медики признали справедливость селекционной теории Йерне (несмотря на 10-летний период ее практически полного неприятия), что выразилось в присуждении ему Нобелевской премии в 1984 году (совместно с его учеником Келером). И вот спустя три года Нобелевская премия вручается опять ученику Йерне Сусуму Тонегаве. К тому же, немаловажен и факт идеологической основы работы Тонегавы — ее опоры на теорию Йерне о соматической генерации разнообразия антител при иммунной защите.

Применительно к проблеме антителообразования крылатая фраза Тейтема «Один ген — один фермент» оказалась неприемлемой, поскольку обнаружилось явное несоответствие между возможным числом генов, способных хранить информацию о структуре антител (сотни), и числом требуемых вариантов антител (около 10 миллионов).

Это противоречие удалось устранить Тонегаве в экспериментах, результаты которых были опубликованы главным образом в 1976–1978 гг. [9, 11, 17, 18, 20, 22] (хотя первая работа этого цикла была опубликована в 1974 году [19]). Их логика строилась на доказательстве с помощью рестриктаз и рекомбинантной ДНК того факта, что в ходе развития от стволовых клеток до зрелых популяций антителообразующих В-лимфоцитов у мышей происходит реорганизация генов, ответственных за синтез иммуноглобулинов. При этом участки генома перемещаются и повторно перестраиваются на пути к формированию ДНК зрелых лимфоцитов. Часть генетической информации может элиминироваться. В результате различных комбинаций сборки генов длин-

ных и коротких цепей антител получается итоговая сумма, составляющая много миллиардов возможных форм антител. Это создает базу для опережающей реакции на воздействие любых потенциальных антигенов и соответственно выработки в достаточных количествах необходимого варианта антител.

Основной вехой в этой серии работ стало исследование Тонегавы, опубликованное в 1976 году [20], в котором он впервые убедился в возможности существования соматической диверсификации в генной системе, кодирующей у мыши h легкие цепи. Дальнейший ход экспериментов подтверждал справедливость идеи соматической генерации разнообразия антител. В этом ряду сам автор придает особое значение опытам, выполненным совместно с Ритой Шуллер, по выделению геномных клонов λ и ξ кДНК [8, 17]. Их результаты представлены на рисунке 1.

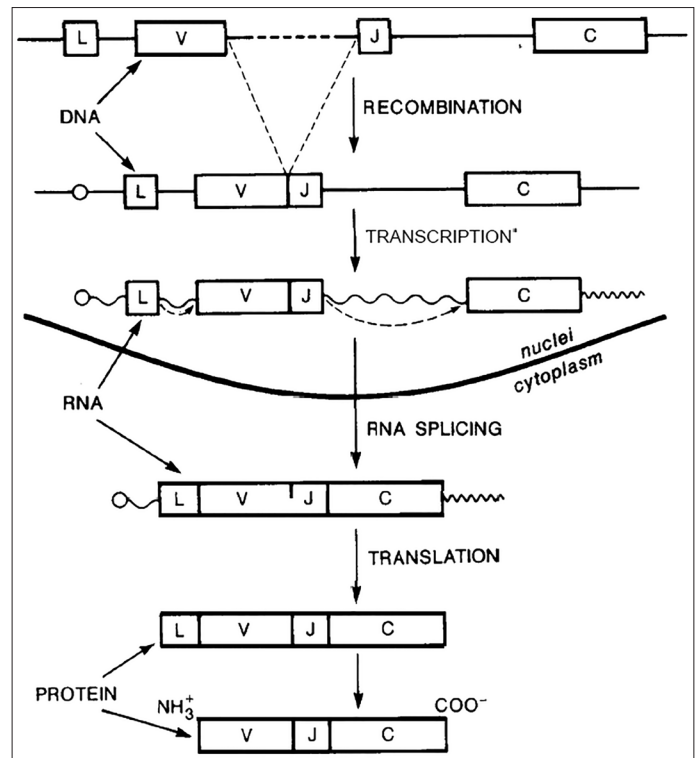


Рис. 1. Схема реорганизации и экспрессии гена легкой цепи иммуноглобулина (из Нобелевской речи Тонегавы [21])

Анализ этих клонов с помощью картирования рестриктаз и ДНК-секвенирования не только подтвердил соматическую перестройку генов иммуноглобулина, но также выявил поразительные особенности их устройства и реорганизации.

Сам Тонегава так подытоживает суть своих выводов в Нобелевской речи: «В иммунной системе

организмы эксплуатируют два главных процесса для модификации ДНК — рекомбинацию и мутацию — как средство соматической диверсификации ограниченного количества генетической информации, для того чтобы охватить бесконечное множество различных антигенов» [21].

Венцом этого цикла работ Тонегавы стало присуждение ему в 1987 году Нобелевской премии «за открытие генетического принципа происхождения разнообразия антител».

Есть интересный исторический факт: феномен участия японцев в ключевых разработках в иммунологии. Рубежи здесь такие: 1901 г. — получение первой Нобелевской премии Берингом (соавтором по его открытию дифтерийного антитоксина был японский исследователь Китасато; 1967 г. — открытие IgE супругами Ишизака; 1987 г. — обнаружение Тонегавой генетических основ разнообразия антител [1]. То есть, все происходит, как в греческом театре: часто внезапно появляется Deus ex machina («Бог из машины») — неожиданное разрешение ситуации, фактически, как принято говорить, в нужное время и в нужном месте. Кто знает, быть может, и в XXI веке обнаружит свои чудесные свойства загадочная японская нация и появятся их новые имена, например, связанные с разработкой вакцины против доселе неизвестных опасных инфекций типа лихорадки Эбола и т.д.. Кстати, вышла специальная статья японского автора о влиянии ученых Страны Восходящего Солнца на развитие аллергологии [16].

После занятий фундаментальной иммунологией ученый продолжил свои научные исследования в области нейронаук, сосредоточив внимание на вопросах обучения и памяти. Как это часто бывает, после эпохальных работ выдающихся химиков обращение их к наукам о мозге обычно не повторяло их феноменальные успехи в родной области. Через это прошли многие абсолютные гении молекулярной биологии: Дельбрюк, Крик, Уотсон, Ниренберг. По такой же стезе прошел и Тонегава. Им напечатан ряд высокопрофессиональных статей в ведущих журналах, выдвигаются оригинальные подходы и формулируются концепции, создан специальный институт для исследований по данному профилю, но 30 лет работы все-таки уступают тому взлету мысли и дела, которые характеризовали его короткий эффективный труд по объяснению разнообразия антител.

Один из авторов настоящего исследования встретился с Тонегавой в начале 1980-х годов в Швейцарии и Германии во время своей зарубежной командировки.

Японский ученый еще не был увенчан Нобелевской премией, однако его сильные, убедительные работы по соматической генерации антител были хорошо известны специалистам и в корпоративной среде он пользовался уважением.

Звания, награды. Тонегава удостоен, кроме Нобелевской премии, ряда наград и почетных званий. Прежде всего, на родине в 1981 году ему была вручена Genetics Grand Prize of Genenics Promotion Foundation, он был награжден орденом культуры «Bunkakunsho» Императора Японии (1984). Он получил престижные награды в Германии (тогда Западной): Премию Эйвери Ландштейнера Общества иммунологов (1981), Премию Роберта Коха Фонда Роберта Коха (1986). Отмечен он также соответствующими знаками внимания в США: Louisa Gross Horwitz Prize Колумбийского университета, Нью-Йорк (1982), Награда Альберта и Мэри Ласкер, Нью-Йорк Сити (1987), почетный профессор Массачусетского технологического института с 1981 г.

Труды. Базовый список работ ученого, связанный с его основополагающими исследованиями в иммунологии (более 20 статей), приведен в Нобелевской речи [21]. О его выдающемся открытии были публикации и на русском языке [6]. Нейробиологический аспект отражен в ряде работ Тонегавы [10, 13, 24]. Как уже указывалось, этот более поздний цикл работ ученого посвящен проблеме обучения и памяти. В данном разделе им было выбрано оригинальное направление, сочетающее в себе подходы молекулярной биологии и поведенческие методы. Внимание было сосредоточено главным образом на память, связанную с гиппокампом, то есть память на события, факты, пространство и т.д. В результате целенаправленных исследований был получен ряд интересных фактов, касающихся запоминания и извлечения из памяти. Например, было продемонстрировано, что NMDA-рецепторы в нервных цепях поля СА3 гиппокампа играют ключевую роль как в быстром запоминании, так и в извлечении эпизодической памяти. Другое направление посвящено идентификации генов, пониженная активность которых может иметь отношение к развитию шизофрении и задержке умственного развития. Недавно в его лаборатории разработана новая генно-инженерная технология, которая позволяет блокировать синаптическую трансмиссию в специфических нервных путях у мыши.

Более подробные списки публикаций и литературы о нем собраны в материалах МИТ и Пиковеровского института и других источниках [12, 13, 23]. Существуют и биографии ученого [5, 7, 12–15].

Литература

1. Воробьева О.В., Гушин И.С. Молекулярно-биологические основы алергенспецифической иммунотерапии // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2011. — Т. 7. — № 3. — С. 54–71.
2. Воробьева О.В. К 100-летию со дня рождения выдающегося иммунолога Нильса Йерне // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2011. — Т. 7. — № 2. — С. 63–72.
3. Воробьев В.С. К 100-летию со дня рождения выдающегося молекулярного биолога Сальвадора Луриа // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2012. — Т. 8. — № 3. — С. 65–73.
4. Воробьев В.С. К 100-летию со дня рождения Ренато Дульбекко — выдающегося молекулярного биолога XX столетия // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2014. — Т. 10. — № 2. — С. 65–70.
5. Марьянович А.Т., Князькин И.В. Взрыв и цветение. Нобелевские лекции по медицине 1901–2002. — СПб.: Изд-во ДЕАН, 2003. — С. 412–416.
6. Тонегава С. Молекулы иммунной системы // В мире науки. — 1985. — № 12. — С. 75–87.
7. Тонегава Судзуми [Электронный ресурс] https://ru.wikipedia.org/wiki/Тонегава,_Судзуми.
8. Brack C., Hirama M., Lenhard-Schuller R., and Tonegawa S. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination // Cell. — 1978. — Vol. 15. — P. 1–14.
9. Hosumi N. and Tonegawa S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1976. — Vol. 73. — No. 10. — P. 3628–3632.
10. Kamsler A., McHugh T.J., Gerber D., Huang S.Y., Tonegawa S. Presynaptic m1 muscarine receptors are necessary for mGluR long-term depression in the hippocampus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2010. — Vol. 107(4). — P. 1618–1623.
11. Lenhard-Schuller R., Hohn B., Brack C., Hirama M., and Tonegawa S. DNA clones containing mouse immunoglobulin κ chain genes isolated by in vitro packaging into phage λ coats // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1978. — Vol. 75. — P. 4709–4713.
12. MIT Biology [Электронный ресурс] https://biology.mit.edu/people/susumu_tonegawa.
13. Picower Institute for Learning and Memory [Электронный ресурс] <https://picower.mit.edu/Faculty/PrincipalInvestigators/susumu-tonegawa>.
14. RIKEN Brain Science Institute [Электронный ресурс] <http://www.brain.riken.jp/en/faculty/details>.
15. Susumu Tonegawa — Biographical. [Электронный ресурс] http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1987/tonegawa-autobio.html.
16. Takai T. and Karasuyama H. The study of allergy by Japanese researchers: a historical perspective // Int. Immunol. — 2009. — Vol. 21. — No. 12. — P. 1311–1316.
17. Tonegawa S., Brack C., Hozumi N. and Schuller R. Cloning of an immunoglobulin variable region gene from mouse embryo // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. — No. 8. — P. 3518–3522.
18. Tonegawa S., Maxam A.M., Tizard R., Bernard O. and Gilbert W. Sequence of a mouse germ-line gene for a variable region of an immunoglobulin light chain // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1978. — Vol. 75. — P. 1485–1489.
19. Tonegawa S., Steinberg C., Dube S., and Bernardini A. Evidence for somatic generation of antibody diversity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1974. — Vol. 71. — No. 10. — P. 4027–4031.
20. Tonegawa S. Reiteration frequency of immunoglobulin light chain genes: further evidence for somatic generation of antibody diversity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1976. — Vol. 73. — No. 1. — P. 203–207.
21. Tonegawa S. Somatic generation of immune diversity. Nobel lecture. — 1987 [Электронный ресурс] http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1987/tonegawa-nobel_lecture.html.
22. Tonegawa S. and Steinberg C. Too many chains — too few genes / In: A. Cunningham (Ed.) The Generation of Antibody Diversity: A New Look. — Academic Press, New York, 1976. — P. 175–182.
23. Tonegawa S. That Great Time in Basel // Cell. — 2004. — Vol. S116. — P. S99–S101.
24. <http://bcs.mit.edu/people/tonegawa.html>.

Резюме. В связи со 75-летием со дня рождения Сусуму Тонегавы, крупного японского ученого, иммунолога, молекулярного биолога и нейробиолога, анализируются его жизнь и творчество.

Ключевые слова: молекулярная биология, иммунология, нейробиология, история, биографии, Сусуму Тонегавы.

**ON THE 75TH ANNIVERSARY OF A MAJOR IMMUNOLOGIST
AND MOLECULAR BIOLOGIST SUSUMU TONEGAWA**

O.V. VOROBYEVA, V.S. VOROBYEV, R.G. VASILOV

Yu.A. Ovchinnikov Russian Biotechnology Society, Moscow

In connection with the 75th anniversary of the birth of Susumu Tonegawa, a major Japanese scientist, immunologist, molecular biologist and neurobiologist, his life and works were analyzed.

Keywords: molecular biology, immunology, neurosciences, history, biographies, Susumu Tonegawa.

ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2014 ГОДА*

ПЕРСОНАЛИИ

**К 120-летию со дня рождения
академика В.А. Энгельгардта**

В декабре 2014 года исполняется 120 лет со дня рождения выдающегося отечественного биохимика, одного из основателей молекулярной биологии в нашей стране, академика АН и АМН СССР Владимира Александровича Энгельгардта (1894–1984).

В.А. Энгельгардт родился 4 декабря (21 ноября) 1894 года в Москве. Семья его постоянно проживала в Ярославле. Отец — Александр Владимирович — принадлежал к знаменитому баронскому роду Энгельгардтов (один из его представителей, так называемой лифляндской ветви — Егор Антонович Энгельгардт, 1775–1862 — был директором Царскосельского лицея в период обучения в нем Пушкина; среди других известных Энгельгардтов значится и племянник светлейшего князя Потемкина-Таврического). Начальное обучение будущий биохимик получил в Царскосельской частной школе Левицкой, после чего перевелся в Ярославскую губернскую гимназию, которую окончил с серебряной медалью.

По окончании гимназии он поступил на математический факультет Московского университета. Потом перешел на медицинский факультет. В университетские годы ему довелось слушать лекции Н.К. Кольцова,

произведшие на него большое впечатление. В своей автобиографии он приводит в этой связи такой памятный случай. Прослушав очередную лекцию Николая Константиновича, студент Энгельгардт обнаружил ошибку в его толковании природы влияния рН на фагоцитоз у одноклеточных организмов. Он поставил самостоятельные проверочные эксперименты, продемонстрировал их в лаборатории Кольцова и не побоялся сказать учителю о его неверном суждении (оказалось, что решающим фактором является электрический заряд фагоцитируемых частичек туши, а не поведение животных, как говорилось на лекции). Великий биолог искренне поблагодарил внимательного студента и выразил согласие с тем, что факт выше толкования или авторитета.

Энгельгардт во время учебы трудился в различных биохимических лабораториях. В 1916–1917 гг. работал в университете Шаньвского. Университет окончил в 1919 году, после чего два года служил врачом на Южном фронте (шла гражданская война).

В 1921 году началась научная деятельность молодого Энгельгардта — он был принят в Биохимический институт Наркомздрава РСФСР. Здесь ему пришлось заниматься иммунологией и изучать антиферменты. Работал он в нем до 1929 года.

Существенное влияние на его становление оказала двухмесячная стажировка в берлинской лаборатории Петера Рона при клинике «Шарите» в 1927 году. В Берлине он, помимо практической работы, имел возможность общаться с известными биохимиками (Ф. Липман, Г. Кребс и др.). Особенно следует подчеркнуть знакомство, переросшее потом в долгую дружбу, с Отто Варбургом и Отто Мейергофом, европейскими знаменитостями, лауреатами Нобелевской премии, создателями биохимии XX века. Ясно, что для поддержания близких отношений со столь выдающимися людьми требуется наличие достаточно высоких профессиональных и личностных качеств, а они у Энгельгардта, безусловно, были.

В 1929 году Владимир Александрович защитил диссертацию и стал профессором, заведующим кафедрой биохимии Казанского медицинского института. Казанские годы (1929–1933) были очень плодотворными для него. Несмотря на скромное кафедральное оборудование удалось создать минимум приборов для проведения научных исследований по теме изучения обмена веществ в клетке. Был подобран удачный объект — ядросодержащие эритроциты голубей, которыми их щедро снабжали за вознаграждение казанские мальчишки. Итог был впечатляющ:

* Материал подготовлен В.С. Воробьевым

было обнаружено, что дыхание клетки может повлечь за собой синтез АТФ. Данный процесс был назван им «респираторный ресинтез АТФ», что впоследствии в мировой науке получило наименование «окислительное фосфорилирование». Результаты этих экспериментов были напечатаны в «Казанском медицинском журнале», 1931, № 4–5, а затем в 1932 году в зарубежном журнале «Biochemische Zeitschrift». Это — выдающееся открытие в науке уровня Нобелевской премии.

Для людей со столь высокой мотивированностью к научным занятиям, как Энгельгардт, пребывание в Казани, городе с университетскими традициями, где трудились А.Я. Данилевский, А.М. Бутлеров, Н.Н. Зинин, стало знаковой вехой в определении собственного пути в науке и становлении как специалиста-биохимика.

Именно в Казани начался процесс создания школы Энгельгардта. Он умел подбирать себе соотарищей по научным поискам (специалисты знают о его коллегах и учениках — А.А. Прокофьева-Бельговская, А.Е. Браунштейн, А.Д. Мирзабеков и др.). Здесь же, на Волге началась более чем 50-летняя научная дружба с его верным соратником Александром Александровичем Баяевым, которую не разрушили даже испытания 19-летним тюремным заключением последнего. В Казани Энгельгардт нашел и спутницу жизни и постоянного сотрудника — Милицу Николаевну Любимову, дочь ректора университета, известного патологоанатома Николая Матвеевича Любимова. В науке мы часто видим прекрасные свидетельства благотворности такого супружеского сочетания в науке: жена Н.В. Тимофеева-Ресовского — урожденная Фидлер, находившаяся в родстве с И. Кантом, была квалифицированным генетиком, хрестоматийны примеры супругов Фохтов и Дежерингов в неврологии и т.д.

Начиная с этого периода Энгельгардт открыл эпопею освоения трех главных университетских городов с высокой химической культурой — Москвы, Ленинграда, Казани. В разные годы он трудился: в Ленинграде — в Ленинградском государственном университете им. А.А. Жданова (1933–1940), Институте физиологии им. И.П. Павлова (1944–1950), Институте экспериментальной медицины (1945–1952); в Казани — в Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова (Ленина) и медицинском институте (1929–1933); в Москве — Институте биохимии им. А.Н. Баха (1935–1959, а ранее в нем же, но под другим наименованием — 1921–1929), Московском государственном университете (1936–1959) и созданном и возглавленном им нынешнем Институте молекулярной биологии

РАН, носящем его имя, — в 1959 г. (сначала назывался Институт радиационной и физико-химической биологии). В 1955–1959 гг. он был академиком-секретарем Отделения биологических наук АН СССР.

В краткой юбилейной заметке вряд ли целесообразно входить в детали научного творчества и подробности жизнеописания. Важно осветить наиболее существенное в его деятельности.

Конечно, на первый план выходят личные научные достижения. Главные его дела:

- открытие окислительного фосфорилирования — процесса аэробного ресинтеза АТФ, сопряженного с клеточным дыханием; демонстрация совместно с М.Н. Любимовой того, что основной структурный белок мышц миозин обладает свойствами фермента АТФазы (Государственная премия 1943 г.), а также и других значимых для биохимии фактов;
- поддержание мирового уровня биохимических исследований, участие в искоренении лысенковщины и создание Института молекулярной биологии;
- развертывание молекулярно-биологических исследований в стране, руководство проектом «Реввертаза».

Человек энциклопедических знаний — поэтому он был редактором многочисленных печатных изданий (БМЭ в том числе) и членом ряда научных советов и комиссий. Был главным редактором журналов «Биохимия» (1944–1966) и «Молекулярная биология» (1966–1984). Возглавлял Научный совет по проблемам молекулярной биологии АН СССР (1961–1984). При его участии выходили в свет многие переводные новинки в биохимии, включая и сверхпопулярную в научном мире «Двойную спираль» Уотсона. Излишне говорить о той целенаправленной печатной продукции, которую выпускал Институт молекулярной биологии и которая фактически формировала новое мировоззрение у целого поколения исследователей в СССР.

Такие люди, как Энгельгардт, выполняли и на международном уровне незаменимую дипломатическую миссию. Они представляли нашу великую страну за рубежом в условиях ее изоляции и пропагандистских антисоветских кампаний. На фоне этих насаждаемых стереотипов за границей появлялись пришедшие на смену И.П. Павлову и другим маститым дореволюционным седовласым авторитетам такие высокообразованные, знающие, эlegantные, полные оптимизма и уверенности в себе ученые, как А.Н. Несмеянов, А.Н. Белозерский, В.А. Энгельгардт, Н.Н. Семенов. Они производили на зарубежную интеллигенцию соответствующее впечат-

ление и последующую благоприятную реакцию, перерастающую, как правило, в нормальные, свойственные для научной среды взаимоотношения. Надо себе представлять, что значил для страны в те годы Энгельгардт, олицетворявший собой прогрессивные преобразования в отечественном естествознании после лысенковского зстоя. Не зря некоторые иностранцы, видя его за границей, восхищенно восклицали: «Кто этот джентльмен?».

Поэтому трудно переоценить вклад Владимира Александровича в международное признание нашей науки, сделанный им в те годы. Благодаря протекции Арчибалда Хилла (лауреата Нобелевской премии 1922 года за открытие скрытого теплообразования в мышцах) он был введен сначала в бюро Международного совета научных союзов (Хилл был президентом совета), а затем стал его вице-президентом. После президентом совета был Рудольф Питерс, с которым Энгельгардт также находился в дружеских отношениях. В данном совете он состоял с 1955 по 1963 гг. Все это во многом способствовало развитию контактов с иностранными учеными, в которых так нуждалась особенно биологическая наука того времени. Работала в этом направлении и активность Энгельгардта в других международных организациях — Международное Пагуошское движение ученых (1973—1984), Советский комитет защиты мира и др.

Ясно, что такой крупный ученый был удостоен многих наград и званий. Среди них есть наиболее почетные — Золотая медаль им. М.В. Ломоносова АН СССР (1969) и членство в Лондонском Королевском обществе (1970). Память о нем увековечена в присвоении в 1988 г. его имени родному институту, его детищу, и регулярно проводимых ежегодных Энгельгардтовских чтениях (в 2014 г. проводятся 30-е чтения). В 1994 году Российской академией наук учреждена Золотая медаль имени В.А. Энгельгардта, присуждаемая 1 раз в 5 лет за выдающиеся работы в области молекулярной биологии.

В целом, Владимир Александрович Энгельгардт был человеком с огромным интеллектом, подлинной государственной мудростью, пронизательностью, тонким остроумием. Ему принадлежит афоризм о своем методе научного руководства — «просвещенной монархии». Все чувствовали его аристократизм, породу, высочайшее достоинство, которые характеризовали его и являлись его сущностью. Он же всегда возражал против заштампованного использования термина «ученый» (особенно от первого лица), отдавая предпочтение словам «исследователь», «научный работник». В этом есть большой, глубокий смысл. Он знал и любил стихи (в гимназиях этот предмет преподавали хорошо, тем более его лю-

бимым педагогом был учитель словесности Алексей Матвеевич Лебедев), ценил стихотворные экспромты и вообще юмор. Нередко в его устную и письменную речь вкрапливались строфы из Тютчева, Пушкина, Гете, как всегда, точно, сбалансированно и к месту.

Помимо биографических материалов о нем, есть еще и уникальная информация — автобиографические записки, опубликованные в специальной книге «Воспоминания об Энгельгардте» (1989). Они называются «Жизнь и наука: автобиография». Всем, кому не безразлична искренняя исповедь столь необычайного человека и у кого есть потребность углубиться в сложные взаимодействия личности и исследователя, рекомендуется ознакомиться с ней.

В автобиографии Энгельгардта много замечательных мест. Ему в ней удалось решить крайне трудную задачу — интегрировать в неразрывное единство факты личной жизни и научные дела. Это и есть кредо настоящего ученого, и образец для подражания молодым.

Как и у многих талантливых людей, обращает на себя внимание его воспоминания о ранней мотивации к познанию истины в виде детского «изобретательства» различных приспособлений или химических «опытов» с обязательным взрывом в конце.

В зрелом периоде налицо проявляется высочайший профессионализм в области препаративной химии и умение определить преемственные точки роста в решении научных проблем. Здесь постоянно чувствуется энгельгардтовский почерк, который особенно проявился в послелысенковский период, когда нужно было срочно повышать уровень молекулярно-генетических исследований. Этому предназначению отвечали создание Института молекулярной биологии, осуществление проекта «Ревертаза» и т.д.

Безусловно, автобиография свидетельствует об оригинальных чертах Владимира Александровича. Исповедь от первого лица дает возможность глубже понять его характер, благородство, одаренность. Любовь к матери — это высший нравственный посыл, данный каждому человеку в ответ на биологически и сакрально детерминированную материнскую привязанность. Именно это качество ставится Энгельгардтом превыше всего, когда он в размышлениях наедине с собой и как бы отвечая на вопрос, хотел ли он что-либо изменить в прошедшей жизни, заметил: «... Я не имею никаких претензий к тому сценарию, который она [судьба] мне удела. Единственно только я пожелал бы продлить жизнь моей матери, которая погибла в юном возрасте от уличного несчастья»

**К 115-летию со дня рождения
академика А.Н. Несмеянова**



В сентябре 2014 года исполнилось 115 лет со дня рождения Александра Николаевича Несмеянова (1899—1980), академика АН СССР, президента АН СССР, крупного отечественного химика-органика. Круглая дата столетия со дня его рождения не была забыта на фоне торжественно праздновавшихся в 1999 году 200-летия со дня рождения Пушкина и 150-летия И.П. Павлова и была отмечена на уровне, подобающем деятелю сходного ранга. Еще ранее была выпущена его автобиографическая книга «На качелях XX века» (1990), были опубликованы две книги о нем как об ученом и человеке и организаторе науки (1988, 1996), вышли воспоминания жены («Свет любви: Воспоминания об А.Н. Несмеянове, выдающемся советском химике», 1999), был проведен ряд мемориальных мероприятий.

А.Н. Несмеянов родился 28 августа (старого стиля, 9 сентября нового стиля) 1899 года в Москве в семье учителей. Отец, Николай Васильевич, окончил юридический факультет Московского университета и работал сельским учителем в Тульской губернии. Мать, Людмила Даниловна, также была педагогом.

Интерес к химии пробудился у него еще в школьные годы. Кроме того, он обнаружил склонность к изучению биологии.

Период взросления Несмеянова совпал с революционными годами. В 1917 году по окончании гимназии с серебряной медалью он поступил на естественное отделение физико-математического факультета Московского университета, который окончил в 1922 году. Еще в студенческие годы он связал свою судьбу с лабораторией

Н.Д. Зелинского. Поэтому не случайно, что он начал трудиться на этой кафедре. Здесь им последовательно пройдены все ступени роста на педагогическом поприще: ассистент, доцент, профессор (с 1935 года).

В 1938 году он покинул свою alma mater, заняв должность заведующего кафедрой органической химии Института тонкой химической технологии.

Начиная с 1939 года его судьба прочно связывается с судьбой Академии наук. Он становится директором Института органической химии АН СССР. В этом же году Несмеянова избирают членом-корреспондентом, а в 1943 году — академиком (действительным членом) АН СССР. С 1946 по 1951 гг. он занимал пост академика-секретаря Отделения химических наук АН СССР.

В эти же годы Александр Николаевич возвращается в МГУ: возглавляет кафедру органической химии, работает деканом химического факультета (1945—1948) и, наконец, становится ректором первого вуза страны. Эту значимую должность он занимал три года (с 1948 по 1951 гг.), в период строительства нового здания университета на Воробьевых (Ленинских) горах. То есть он становился государственным человеком высокого уровня. Но его ждал еще более ответственный пост — президента Академии наук СССР. Вакансия открылась в связи со скоростной смертью Сергея Ивановича Вавилова, несшего эту нелегкую ношу в трудные послевоенные годы 1945—1951 гг.

Следует подчеркнуть, что это был удивительно верный выбор как членов Академии, так и государственных структур. Александру Николаевичу было 50 лет, он имел достаточный организационный опыт в сфере науки, был крупным, оригинальным исследователем в наиболее приоритетной отрасли для того времени, знал потенциал преподавателей высшей школы.

Он возглавлял Академию в решающую для нашей страны фазу послевоенного восстановления промышленности и экономики в целом. Его десятилетнюю работу в Академии можно приравнять к вкладу других его выдающихся современников. Косыгин, Королев, Курчатов, конструкторы самолетов и кораблей, строители крупных ГЭС — это были люди, которые заложили фундамент нынешнего экономического и социального благополучия страны. К таким относится и Несмеянов. Он и по формальному разряду наград входит в эту когорту: дважды Герой Социалистического Труда, кавалер семи орденов Ленина. И не его вина, а скорее беда, что ему пришлось делать свои беспрецедентные по значимости дела в обстановке противодействия очень высокого уровня руководителей.

Академик Несмеянов ушел со своего президентского поста по собственному желанию 19 мая 1961 года. После ухода из Академии он сосредоточился на работе в созданном им в 1954 году Институте элементоорганических соединений АН СССР. Ученый скончался в 1980 году.

В связи с отмечаемой датой уместно дать некоторый комментарий. Прежде всего, о конфликте между Хрущевым и Несмеяновым в бытность последнего президентом Академии. Это и есть первое из важных дел Президента АН СССР — защита престижа Академии.

Середина XX века была временем бурного развития науки — в первую очередь, органической химии, особенно в связи с развитием химии углеводов, полимеров, металлоорганики и т.д. В России школы химиков-органиков были всегда сильны. Отъезд Ипатьева и Чичибабина за границу в целом не отразился на уровне работ в органической химии — сохранялись школы в Москве, Казани, Ленинграде. Несмеянов был учеником Зелинского и был известным исследователем мирового уровня. К тому же он был активным защитником роли Академии в развитии фундаментальной и соответственно прикладной науки.

Сталин, несмотря на поддержку таких одиозных личностей, как Т.Д. Лысенко и О.Б. Лепешинская, все же признавал роль столь относительно привилегированного института, как сообщество ученых, или Академия. Больше того, при нем была преемственно сохранена и возобновлена после реорганизации бывшая Императорская академия (на уровне национальной) и открыты три новых академии: ВАСХНИЛ (1929), Академия педагогических наук РСФСР (1943), Академия медицинских наук СССР (1944).

Хрущев «терпел» Академию, пока не убедился в ее непримиримой позиции по отношению к перешедшему к нему «по наследству» любимцу, «народному» академику Лысенко. Несмеянов на посту президента АН СССР, видя всю панораму состояния науки в стране и осознавая пагубную роль Лысенко в фактическом разгроме биологии и генетики, что заметно отражалось также и на развитии биологической химии и химии в целом, пытался разъяснить первому лицу государства негативные последствия дальнейшего продолжения деятельности Лысенко. Однако Хрущев не хотел расставаться с «великим преобразователем природы» и объявил, что он скорее закроет Академию, чем отстранит ученого из народа. Да и вообще он часто угрожал, что «разгонит» Академию. В апреле 1961 года состоялся резкий разговор, во время которого Хрущеву было сказано: «Ну что

же: Петр Великий открыл академию, а Вы ее закроете!». Слова, тем не менее, возымели действие на человека с трехклассным образованием. Академия была сохранена. Добровольный уход в отставку Несмеянова — это тоже поступок в поддержку Академии.

Второе — это роль Несмеянова в фактической поддержке развития отечественной биологии (в пределах компетенции Президента АН СССР). Его роль в этом трудно переоценить. Главное — создание Пущинского биологического центра: Президент сам летал на вертолете и подыскал место на берегу Оки. Затем — специальный набор студентов-химиков в МГУ для биологии. Есть в активе у Несмеянова и акция по передаче здания бывшего Горного института Институту химии природных соединений и Институту радиационной и физико-химической биологии — ныне это Институт молекулярной биологии РАН (основатель — В.А. Энгельгардт). Можно этот список продолжать и дальше. Так что социальное значение этого, по сути, первого настоящего президента после революции очень велико. С.И. Вавилов стоит особо, он не успел даже развернуться за 5 лет, и к тому же перед ним стояла тень погибшего брата. А Несмеянов сделал так много для Академии и страны, что эффект чувствуется и сейчас и будет еще долго сохраняться.

Третье — высокий уровень международного признания Несмеянова. Речь идет об избрании его в члены Лондонского Королевского общества в 1961 году. Среди русских ученых, членов этого общества, были также Виноградов, Колмогоров, Амбарцумян, Семенов, Энгельгардт. Полный список включает в себя и Ньютона.

Четвертое — участие в строительстве нового здания Московского государственного университета.

Пятое — создание ВИНИТИ — уникального информационного института, сыгравшего огромную роль в развитии отечественной науки и образования.

Шестое — высочайшая интеллигентность Александра Николаевича. Его близкие сообщают о том, что он любил писать стихи, которые отличались редкой искренностью. Это свидетельство несомненного духовного здоровья.

Надо сказать, что и сам А.Н. Несмеянов в публикации в журнале «Природа» в 1999 году упоминает указанные события, говоря о трех главных делах своей жизни: возведении нового здания МГУ, организации ВИНИТИ и основании Института элементоорганических соединений. Другие специалисты добавляют еще Вычислительный центр АН СССР. Это хотел подчеркнуть и скульптор, автор памятника А.Н. Несмеянову на Новодевичьем кладбище, изобразив в своей композиции

макет МГУ как символ его вклада в строительство этого здания на Ленинских горах.

Но для полноты картины нужно еще добавить организацию наукоградов с базовыми НИИ: Объединенный институт ядерных исследований (Дубна), Научный центр биологических исследований (Пуццино), Центр физико-химических исследований (Черноголовка).

Таков жизненный итог этого выдающегося человека.

СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

К 70-летию эксперимента О. Эйвери

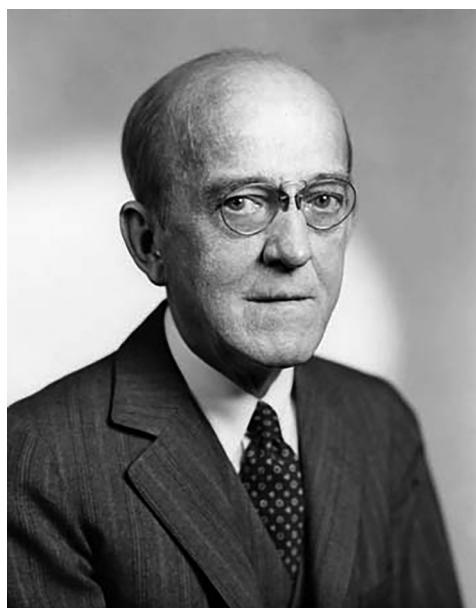


Рис. 1. О. Эйвери (1877–1955)

Опыт Освальда Эйвери (выполненный им в 1944 году совместно с Колином Маклеодом и Маклином Маккарти) является важной вехой в цепи экспериментов, доказывающих центральную догму генетики — роль ДНК в передаче наследственности. Пальма первенства здесь принадлежит Ф. Гриффиту (1928), вторым стал О. Эйвери (1944), третьим — А. Херши (1952).

Само это событие принадлежит к числу парадоксов науки, когда в ходе поиска особенностей одной стороны какого-либо явления открывается принципиальная сущность другого факта и даже целого нового научного направления, как это было, например, с обнаружением феномена радиоактивности Беккерелем. Так и с открытием Эйвери с коллегами. Он профессионально занимался бактериологией и десятилетиями изучал ее частные проблемы, точнее патогенные свойства пневмококка. Микробиологами были и его сотоварищи. Но тем не менее именно им

удалось совершить экстраординарное открытие в генетике и молекулярной биологии.

Исторически сложилось так, что решающей оказалась связка опытов Гриффита — Эйвери. Есть интересное совпадение: оба были бактериологами и родились в одно время, в 1877 году, только по разные стороны океана — Освальд Теодор Эйвери (1877–1955) в США, Фредерик Гриффит (1877–1941) в Великобритании.

Эксперимент Гриффита подробно описан в журнале «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова», 2008, Т. 4, № 2, С. 75–76.

Следует напомнить суть опыта Гриффита, впервые доказавшего наличие явления трансформации у пневмококков, которая состоит в следующем. В результате заражения мышей одновременно клетками неvirulentного штамма (R) и virulentного (S), но убитого нагреванием, способность образовывать капсулу (то есть приобретать патогенные свойства) передается от virulentного к неvirulentному (при этом последний становится патогенным), а далее передается потомству (рис. 2).

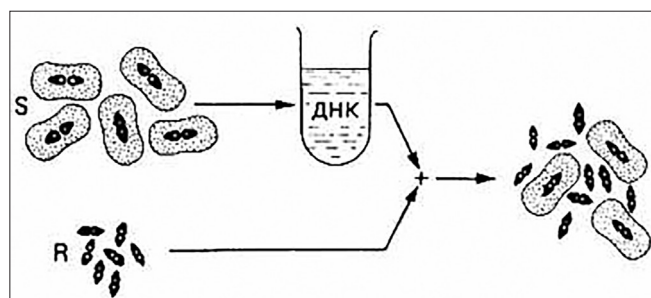


Рис. 2. Общее построение опыта Гриффита (1928)

Эксперимент Эйвери сводился к повторению схемы опыта Гриффита (рис. 3), только с тем добавлением, которое направлено на определение химических свойств фактора трансформации.

Но в подходе Эйвери, Маклеода и Маккарти не ставилась цель прямого копирования опыта Гриффита. Главная линия проведения их эксперимента была в выделении в достаточных количествах агента, обладающего свойством трансформации. На это ушло несколько лет напряженной работы. Бактерии выращивали в больших емкостях с бульоном из бычьих сердец. Virulentные пневмококки были убиты нагреванием, и из них был экстрагирован растворимый в водно-солевом растворе компонент. Белки осаждали хлороформом, а полисахаридные капсулы (источник патогенных антигенов) подвергали ферментативному гидролизу. Остатки бактерий осаждали чистым алкоголем. Для того чтобы убедиться в полной

элиминации капсул бактерий, осуществляли процедуру иммунопреципитации с использованием специфических антител. Затем снова добавляли чистый алкоголь, чтобы выделить трансформирующий агент. После разделения в спирте из фракции выделялись волокнистые тяжи. Метод позволял получать от 10 до 25 миллиграмм агента на 75 л культуры.

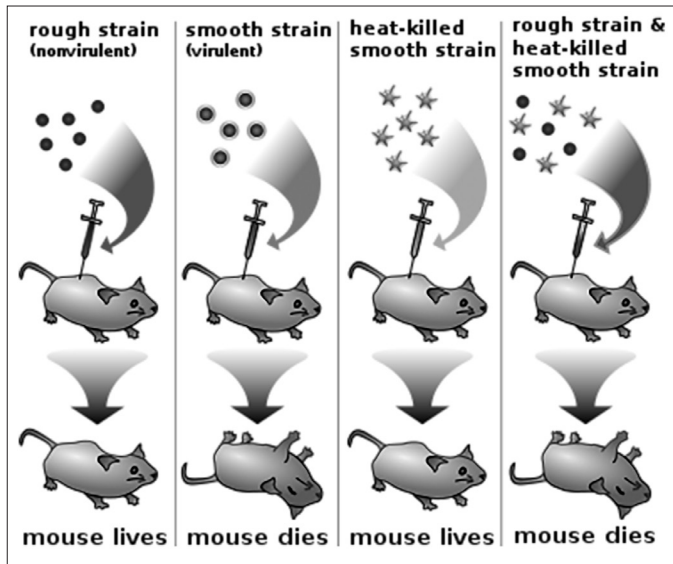


Рис. 3. Повторение схемы опыта Гриффита в эксперименте Эйвери (1944)

Такая процедура давала возможность осуществить довольно широкий химический анализ. Сначала были проведены стандартные качественные тесты на белки, давшие отрицательный результат. Однако качественные тесты на ДНК были сильно позитивны. Химический анализ исследуемого вещества показал, что отношение атомов азота к атомам фосфора равно в среднем 1,67 (1,58–1,75). Это значение очень близко к таковому у ДНК и отличается от белка.

Далее было реализовано тестирование с расщепляющими ферментами. Добавление ферментов, расщепляющих белки и РНК (трипсин, химотрипсин, рибонуклеаза), не действовало на агент, обладающий трансформирующими свойствами, а фермент, расщепляющий ДНК (ДНКаза), полностью разрушал изучаемое вещество.

Проведенные иммунологические тесты, в том числе центрифугирование и электрофорез, обнаружили, что белки и полисахариды отсутствуют, а ДНК имеется.

Получив такие экспериментальные доказательства, Эйвери принял решение о публикации добытых данных. Статья «Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types: Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid

Fraction Isolated from Pneumococcus Type III» была напечатана в журнале «The Journal of Experimental Medicine, 1944, Vol. 79(2), P. 137–158». Авторы: Avery Oswald T., MacLeod Colin M., McCarty Maclyn (рис. 4).

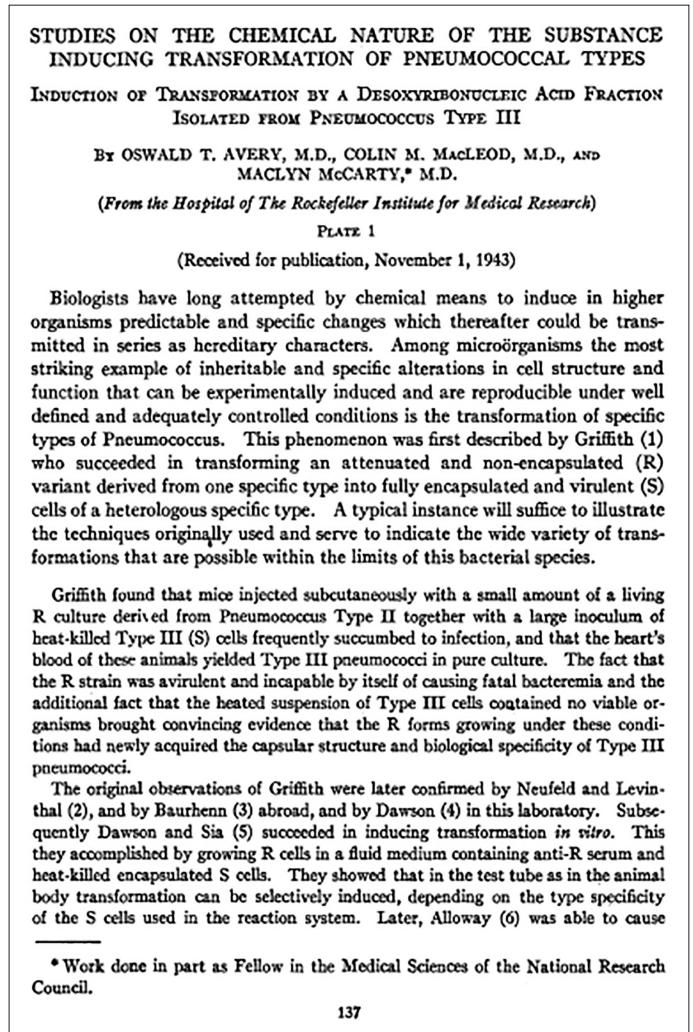


Рис. 4. Факсимиле первой страницы статьи Эйвери и др. (1944)

Можно было понять Эйвери, опытного, 67-летнего исследователя, сделавшего выдающееся открытие, который допустил осторожность в толковании. Цена ошибки была очень велика. Эйвери был человеком своего времени и боялся отойти от примата белков или иных соединений как носителей жизни. Вот его цитата: «...Биологическая активность описанного вещества не является присущим свойством нуклеиновой кислоты, а обусловлена малыми количествами какого-то другого вещества, адсорбированного на ней или тесно связанного с ней, которое не удалось выявить». Соавтор Эйвери – Маккарти также допускал наличие другого фактора, полагая, что на долю ДНК в экстрагированном веществе приходится 99,9%, а остальное — на примесь.

Вообще нужно различать реальное и ретроспективное восприятие фактов, изложенных в указанной статье. Вначале о реакции современников. Во-первых, шла война, и научная жизнь была практически парализована, по крайней мере, в Европе. Поэтому общественный резонанс не был достаточно широк. Во-вторых, в 1944 году большинство биологов было склонно считать, что генами являются белки. Высказывались компромиссные мнения о том, что гены могут быть комбинацией белков и ДНК. Были и активные критики взглядов Эйвери с коллегами среди биохимиков. Существовало и неприятие микробной генетики, поскольку многие факты в этой области появлялись по дрозифильной тематике, а микробы стояли в стороне от хромосом и половой репродукции. В-третьих, статья вышла в свет в журнале, основными читателями которого были медики. В-четвертых, оппоненты и скептики чувствовали неуверенность авторов в своей полной правоте. Эту мысль наиболее точно выразил их знаменитый современник — Джеймс Уотсон: «Как Фрэнсис [Крик], так и я не сомневались, что ДНК представляет собой ген. Однако большинство сомневалось. И снова вы можете сказать: «Почему Эйвери не получил Нобелевскую премию?». Потому что большинство не воспринимало его всерьез. Потому что вы всегда можете оспаривать, что его исследования ограничивались бактериями или что белок устойчив к протеазам и что ДНК просто загрязнена».

Важно продолжить социальный срез в виде высказываний лидеров биологической науки того времени. Наиболее впечатляющая позиция Чаргаффа, одного из первопроходцев в изучении нуклеиновых кислот (всем знакомы его правила): «Я увидел в неясных контурах начало грамматики биологии... Эйвери дал нам первый текст нового языка или, скорее, он показал нам, где искать его. Я решился на поиски». Он сразу же убедился в правоте Эйвери и своими экспериментами с ДНК к 1950 году открыл знаменитые правила и соотношения количеств А-Т и Г-Ц.

Очень показательна и такая деталь. Биохимик Гerti Кори, лауреат Нобелевской премии 1947 года (вместе со своим супругом Карлом Кори за открытие процессов каталитического обмена гликогена), ненавязчиво и тактично посоветовала молодому сотруднику их лаборатории Артуру Корнбергу (тоже будущему Нобелевскому лауреату) обратить внимание на статью Эйвери.

Сразу же оценили истинное значение рассматриваемого труда и Герман Меллер (Нобелевский лауреат 1946 года), и Джошуа Ледерберг (Нобелевский лауреат 1958 года).

Хорошо и своевременно поняли экстраординарный характер сделанного Эйвери члены Лондонского Королевского общества, наградившие его уже в 1945 году медалью Копли за работу по бактериальной трансформации.

Некоторые недоразумения произошли с Нобелевским комитетом. Несмотря на номинирование Эйвери на эту премию, его кандидатура всегда отклонялась. Это объяснялось непреклонной позицией шведских экспертов. Особенно непримирим был Хаммарстен, полагавший сначала, что речь идет о загрязнении материала ДНК белком, а впоследствии то, что, несмотря на демонстрацию наличия ДНК как трансформирующего фактора, не выясняется механизм трансформации. К нему же присоединялся и известный биохимик Мальмгрен, который также считал еще при первых оценках, что ДНК — это не трансформирующий фактор.

Что касается более поздней реакции на публикацию и ретроспективной оценки, то здесь вывод однозначен: это — реальный вклад в формирование молекулярной биологии. За период 1944—1954 гг. статью цитировали 239 раз в профильных журналах по микробиологии, иммунохимии и биохимии. Потом последовало лавинное нарастание ее признания. Нет необходимости упоминать о современной оценке ее значимости: это — классика, вошедшая во все руководства и учебники.

Для исторической достоверности и соблюдения научной этики необходимо дать оценку роли Маклеода и Маккарти (рис. 5, 6).

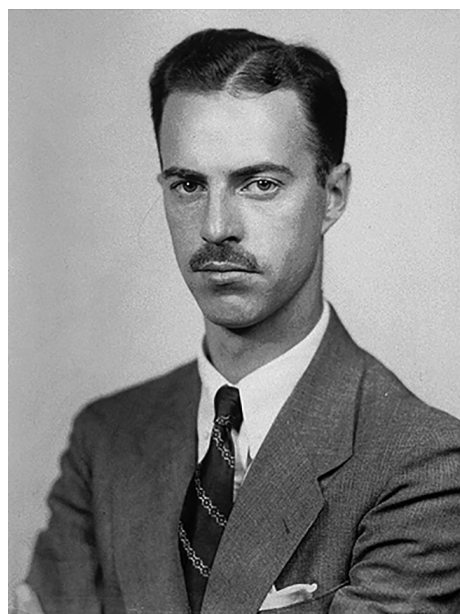


Рис. 5. К. Маклеод (1909—1972)

Коллин Маклеод (1909—1972) начал работать в лаборатории Эйвери в 1934 году и также подключился

к циклу исследований пневмококка, поставив перед собой задачу выделения и идентификации фактора трансформации. Ее решение сосредоточилось на проблеме получения необходимых количеств данного вещества, требуемых для проведения химических анализов. Он модифицировал методику, позволившую работать с большими объемами культур (50–75 л). Организацией этого процесса Маклеод занимался 7 лет.



Рис. 6. М. Маккарти (1911–2005)

После ухода Маклеода в Нью-Йоркский университет в 1941 году (хотя формально он оставался причастным к проекту под руководством Эйвери) к исследованиям в русле изучения фактора трансформации подключился Маклин Маккарти (1911–2005). Он был медиком, но имел биохимическую подготовку и этим отличался от своих старших коллег, бывших только врачами по базовой профессии. Основное его внимание было сосредоточено на очистке фактора. Вскоре было обнаружено, что исследуемое вещество богато нуклеиновыми кислотами, однако обработка РНКазой не инактивирует его. Впоследствии было установлено, что фактор трансформации представляет собой ДНК. Еще до публикации три автора представили отчет об этом в апреле 1943 года в Совет научных директоров Рокфеллеровского института.

В заключение нужно сказать, что в конце II Мировой войны вышли в свет две беспрецедентные работы: статья О. Эйвери с коллегами и книга Э. Шредингера «Что такое жизнь с точки зрения физики?». В последней величайший физик суммировал представление о гене в свете гипотезы Н.К. Кольцова и твердо заявил, что «ген — это аperiodический кристалл». Такое уверенное

суждение о материальном носителе наследственности стоило многого. Молодежь после войны приходила в биологию, уже твердо зная, что здесь их ждут необычные открытия. Работа Эйвери, одобренная крупнейшими химиками того времени, но пока не воспринятая широкой общественностью, также ждала своего часа.

К 50-летию обнародования провирусной гипотезы

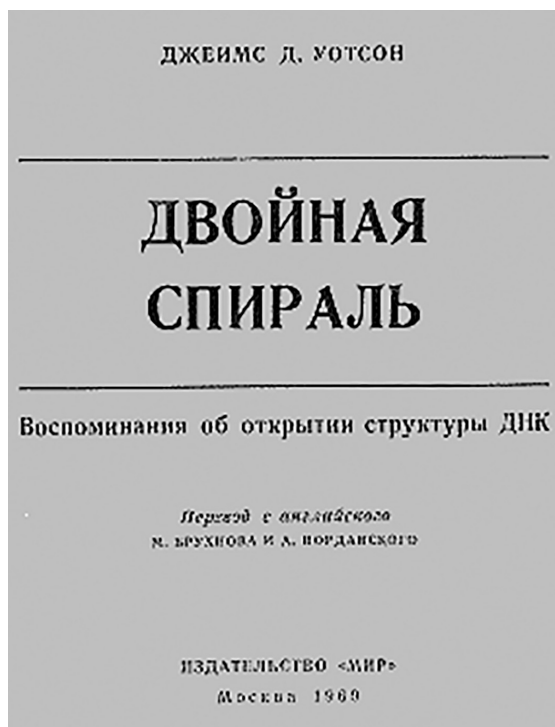
Научное сообщество практически единодушно в том, что самым выдающимся открытием XX века в биологии было открытие структуры ДНК Уотсоном и Криком. Под стать ему и другое открытие — доказательство обратной транскрипции Теминим. Поэтому историки науки не упускают случая, чтобы не напомнить об этих событиях в связи с юбилейной датой.

В 2014 году исполнилось 50 лет со времени широкого обнародования в 1964 году провирусной гипотезы, сформулированной Хоуардом Теминим. Это случилось на фоне нобелевского триумфа первооткрывателей ДНК, состоявшегося два года назад, и окончательного утверждения центральной догмы генетики: ДНК — РНК — белок. И вот на волне всеобщих торжеств молодой, неизвестный большому кругу специалистов 30-летний ученый выдвинул гипотезу (об этом он сообщил еще в 1960 году), согласно которой в белковой оболочке некоторых вирусов содержится фермент, катализирующий или облегчающий копирование вирусных генов в ДНК клетки-хозяина.

Реакция была разной, но большинство специалистов встретило эту гипотезу или с недоверием, или с критикой. Так длилось 6 лет, пока сам Х. Темин и независимо от него Д. Балтимор не открыли этот гипотетический фермент и не назвали его «РНК-зависимая ДНК-полимераза». Впоследствии он получил наименование «обратная транскриптаза», или «ревертаза». Через 5 лет, в 1975 году оба автора были удостоены Нобелевской премии. Дискуссии сразу же стихли, поскольку их открытие зажгло зеленый свет генно-инженерным экспериментам и по сути дало отсчет геномной эре в развитии биологии: формально это случилось после синтеза Полом Бергом в 1972 г. первой рекомбинантной ДНК.

Следует указать на то, что первоначальная альтернативность открытия Теминим обратной транскрипции основной концепции молекулярной генетики была прокомментирована Фрэнсисом Криком в 1970 году в «Nature» в статье «Central dogma of molecular biology». При этом он отмечал, что общие установки молекулярной биологии сохраняют свою силу.

**К 45-летию выхода в свет
«Двойной спирали» Уотсона**



В 1969 году вышел перевод на русский язык знаменитой книги «Двойная спираль», написанной одним из первооткрывателей структуры ДНК, лауреатом Нобелевской премии Джеймсом Уотсоном.

За год до этого она появилась на английском языке и произвела фурор. Такой же восторженный прием ее ждал в русскоязычной аудитории.

Предисловие к русскому изданию было написано академиком В.А. Энгельгардтом, который приложил весь свой талант, чтобы в наилучшем виде представить данное произведение. Это была автобиография, изложенная ярким, образным языком, со специфическим юмором, эскападами, элементами парадоксальности, прямотой и резкостью суждений, изображением показной легкости научного труда, не говоря уже о самоиронической подаче фактов собственной личной жизни. По сути перед всеми как бы раскрылась вся хроника «гонки» за первенство в раскрытии одной из величайших тайн природы — самовоспроизведения наследственной информации на предсуществующих матрицах.

Особенно привлекало это молодежь, поскольку речь шла о беспрецедентном открытии в биологии, которое сделал молодой человек, едва перешагнувший 20-летний рубеж. Под влиянием этой книги в молекулярную биологию пришли десятки талантливых работников, то есть повторилась та же история, когда в 1940-е годы в биологию шли математики и инженеры после прочтения книги Шредингера «Что такое жизнь с точки зрения физика?».

С годами ценность книги Уотсона не уменьшается и ее продолжают читать новые поколения на страницах ее переизданий и в Интернете.

СОБЫТИЯ 2014 ГОДА

**Европейский биотехнологический конгресс-2014
(Лечче, Италия, 15–18 мая 2014 года)***

15–18 мая 2014 года в Лечче (Италия) состоялся Европейский биотехнологический конгресс-2014 (European Biotechnology Congress 2014). Конгресс проводится ежегодно начиная с 2011 года в разных городах (Стамбул, Братислава). В рамках этого крупного мероприятия в мае с.г. прошли заседания по следующим направлениям:

- растительная биотехнология;
- стволовые клетки, биоматериалы, тканевая биотехнология;
- фармацевтическая биотехнология;
- биосенсоры;
- пищевая биотехнология;
- биокатализ и биотрансформация;
- биоинформатика и системная биология;
- медицина и биотехнология;
- инженерия ферментов и белков;
- инженерия биопроцессов;
- экологическая биотехнология — биотехнология и этика;
- возобновляемые ресурсы, biorefinery, биоэнергетика, биотопливо, биопродукты;
- биотехнология животных;
- нанобиотехнология;
- медицинская биотехнология;
- «OMNICS»-науки.

**Международная научная конференция «Физиология и биотехнология фототрофных микроорганизмов: взгляд в будущее»
(Москва, 27–30 мая 2014 года)**

27–30 мая 2014 года в Москве, на биологическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова прошла Международная научная конференция «Физиология и биотехнология фототрофных микроорганизмов: взгляд в будущее». Было сделано 50 докладов и 19 стендовых сообщений. К конференции была приурочена Школа молодых ученых по биотехнологии микроводорослей.

* Материал подготовлен А.Н.Василенко, С.М.Озерской (ИБФМ, Пушкино)

**16-й Европейский конгресс по биотехнологии
(Эдинбург, Шотландия, 13–16 июля 2014 года)**

13–16 июля 2014 года в Эдинбурге (Шотландия) прошел 16-й Европейский конгресс по биотехнологии (16th European Congress on Biotechnology). Конгресс проводится 1 раз в 2 года и организуется Европейской федерацией биотехнологии. В нем приняли участие 1400 делегатов, 150 основных докладчиков, 50 экспонентов. На постерную сессию были приглашены 1000 участников.

В круг обсуждаемых вопросов были включены экологическая и зеленая биотехнология, медицинская биотехнология, физиология микроорганизмов, синтетическая и системная биология микроорганизмов, прикладной биокатализ, промышленная биотехнология, биохимическая инженерия и др.

**VII Международная конференция
«Глобальный микробный идентификатор»
(Йорк, Великобритания, 11–12 сентября 2014)**

В период до полногеномной эры в идентификации микроорганизмов использовались различные методы молекулярного анализа, такие как ДНК-ДНК гибридизация, ПЦР, пульс-электрофорез (PFGE) макрорестрикционных фрагментов ДНК, амплификация с произвольными праймерами (AP-PCR и RAPD), анализ множественных tandemных повторов (MLVA) и др.

Однако для многих из них характерно наличие серьезных недостатков, таких как трудности в стандартизации между странами, а также между лабораториями внутри стран. Кроме того, эти методы часто довольно трудоемки и требуют много времени, необходимого высококвалифицированного персонала и дорогостоящего оборудования и в целом относительно дороги. Полногеномное секвенирование преодолевает многие из этих старых проблем.

Проект «Глобальный микробный идентификатор» представляет собой геномную эпидемиологическую базу данных для глобальной идентификации микроорганизмов с целью выявления инфекционных заболеваний и новых, ранее не известных, патогенов человека, растений и животных.

11–12 сентября 2014 г. в Йорке (Великобритания) на базе The Food and Environment Research Agency (FERA) состоялась VII Международная конференция по проекту «Глобальный микробный идентификатор» (Global Microbial Identifier, GMI).

Этот проект развивается с 2011 года как платформа для хранения полногеномных данных (Whole Genome Sequencing, WGS) микроорганизмов для определения отдельных генов и сравнения полных геномов при необходимости быстрой идентификации неизвестных инфекций, вызываемых микроорганизмами — патогенами растений, животных и человека. Проект GMI объединяет в настоящее время приблизительно 200 исследователей из разных стран мира. Особенностью проекта является четкая направленность на получение практических результатов. Руководит проектом GMI комитет в составе 10 человек, большая часть которых представляет США и Европейский Союз.

В составе проекта GMI определено пять направлений, по которым работают отдельные группы исследователей.

Группа 1 взаимодействует с руководством стран-участниц, обеспечивает построение глобальной информационной сети, разрабатывает стратегический план развития процессов практического использования результатов работ GMI на глобальном, региональном и национальном уровнях. Практически участники данной группы устанавливают в странах-участниках функциональные связи со структурами, принимающими политические решения в области здравоохранения, а также взаимодействуют с региональными и международными организациями этого профиля.

Большое значение придается организации международного обсуждения вопросов здравоохранения, координации деятельности различных организаций в данной сфере, согласованности полученных метаданных, открытому доступу к полногеномным базам данных, передаче штаммов микроорганизмов через границы, вопросам интеллектуальной собственности и др.

Группа 2 занимается информационными системами секвенирования и хранения метаданных, разрабатывает информационный стандарт для ввода минимально необходимых для сопоставления молекулярно-генетических данных — Minimum Data for Matching (MDM), основанный на стандарте Международной базы данных по нуклеотидным последовательностям (International Nucleotide Sequence Database Collaboration, INSDC) и предназначенный

для универсального и глобального поиска в базах данных GMI. MDM может дополняться аннотациями и другими метаданными.

Группа 3 определяет стратегию разработки средств анализа данных для оптимального позиционирования и функционирования системы GMI, формирует требования к GMI с позиции конечного пользователя, проводит ранжирование исследований с учетом приоритетности задач и конкретных заболеваний, проводит анализ аналитических средств и определение, какие фрагменты генома наиболее перспективны для использования в процессе идентификации, обеспечивает распределенную систему сравнения данных, быстроту диагностики и доступность в обмене данными, рассматривает имеющиеся программные средства.

Четвертая и пятая группы занимаются вопросами качества получаемых результатов и разработкой специальных пилотных проектов.

На рабочих встречах (конференциях) по проекту GMI происходит обмен опытом молекулярно-генетических технологий в исследовании микроорганизмов и освоении средств информатики для совершенствования диагностики заболеваний, их изучения и лечения, проводится оценка прогресса в решении задач этой сферы и уточнение стратегии, направленной как на интеграцию стран-участниц, так и на разработку необходимых информационных сетей.

Тематика устных и стендовых сообщений на последней конференции (7 GMI) в Йорке касалась решаемых практических задач в таких областях, как:

- пищевая безопасность, здравоохранение;
- быстрая идентификация патогенов;
- геномная эпидемиология;
- использование средств ИТ в управлении биологической информацией, обработке и анализе данных, биоинформатике, создании Полного Генома патогенов.

Основное внимание было уделено вопросам, связанным с рассмотрением различных аспектов, связанных с представителями родов *Campylobacter*, *Cronobacter*, *Escherichia*, *Listeria*, *Salmonella* и *Shigella*.

Частично материалы докладов GMI 7 размещены на сайте GMI, на странице <http://www.globalmicrobialidentifier.org/News-and-Events/Previous-meetings>.

Сообщество GMI открыто для вступления новых членов, регистрация открыта на сайте проекта — <http://www.globalmicrobialidentifier.org/Workgroups/Membership>.

**Международная конференция
«Биотехнологии в химико-лесном комплексе»
(Архангельск, 11–12 сентября 2014 года)**

11–12 сентября 2014 года в Архангельске состоялась Международная конференция «Биотехнологии в химико-лесном комплексе». Были заслушаны пленарные, секционные и стендовые доклады. Научные направления конференции;

- ферментные технологии в целлюлозно-бумажной промышленности;
- создание высокоэффективных биокатализаторов для использования в химико-лесном комплексе;
- фундаментальные и прикладные основы ферментативных методов анализа в химико-лесном комплексе;
- биоконверсия растительного сырья;
- современные методы очистки сточных вод;
- лесная биотехнология.

В рамках работы конференции была организована Школа молодых ученых «Современные тенденции в создании высокоэффективных ферментных комплексов для биоконверсии растительного сырья».

**Международная научная конференция
по биоорганической химии, биотехнологии
и бионанотехнологии, посвященная 55-летию
Института биоорганической химии им. академиков
Ю.А. Овчинникова и М.М. Шемякина
РАН и 80-летию со дня рождения академика
Ю.А. Овчинникова
(Москва, 15–19 сентября 2014 г.)**

15–19 сентября 2014 г. в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН состоялась Международная научная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 55-летию ИБХ РАН и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова.

Программа конференции была обширна и включала в себя пленарные и постерные сессии, конкурс молодых ученых и выступления молодых ученых ИБХ РАН.

В работе Конференции приняли участие выдающиеся зарубежные ученые, в их числе Сидней Альтман, лауреат Нобелевской премии 1989 года по химии за исследования каталитической активности РНК, а также известные исследователи Анжело Ацци, Эрнесто Кара-

фоли и др. Доклады сделал ряд ведущих отечественных ученых. Наряду с ними на конференции выступили с докладами руководители подразделений и научных направлений ИБХ РАН.

Всего состоялось 13 пленарных сессий, на которых были обсуждены наиболее актуальные проблемы молекулярной биологии.

Тематика отдельных пленарных сессий была посвящена обсуждению конкретных проблем. Большое внимание было уделено молекулярно-биологическим основам механизма действия и создания лекарственных препаратов.

В последнее время одной из центральных тем в этой области становится исследование патогенеза и медикаментозной терапии болезни Альцгеймера.

На конференции данному вопросу посвятили свои сообщения М.Г. Агаджанян «Болезнь Альцгеймера: стратегия активной и пассивной вакцинации», С.А. Козин, А.А. Макаров «Роль металл-связывающего домена бета-амилоида в патогенезе болезни Альцгеймера».

По-прежнему востребована и активно разрабатывается проблема создания новых лекарственных препаратов пептидной природы (Дейгин В.И., Мясоєдов Н.Ф.).

В.В. Власов представил данные в аспекте использования нуклеиновых кислот как терапевтических препаратов и мишеней. Ю.А. Чизмаджев изучал липидно-белковые молекулярные механизмы, отвечающие за вирусную инфекцию клетки.

Исследованы механизмы контроля клеточного цикла (Пестель Р.Г.) и клеточная сигнализация посредством фосфорилирования тирозина при терапии рака (Шлессинджер И.).

Показано значение для терапии мультифункциональных наноконструкций (Деев С.М.). Вопросы иммунологии были обсуждены в ряде докладов (Имле Ж.-Л., Габиров А.Г.).

Фундаментальные проблемы всегда относятся к числу приоритетных. Тема рибосом рассмотрена на специальной сессии: разносторонние аспекты функции полирибосом проанализировал А.С. Спирин.

В докладе А.А. Богданова подчеркивается ключевая роль рибосомной РНК в передаче функциональных сигналов в рибосоме, а О.А. Донцовой отмечаются необычные свойства теломеразной РНК.

Структурная организация белков была также предметом отдельного рассмотрения, в частности, внимание было уделено флуоресцентным белкам (Плетнев В.З., Лукьянов К.А.).

Группа исследователей затронула тему основ сенсорной трансдукции. Так, М.А. Островским изучены зрительный пигмент родопсин и различия в спектральной чувствительности у озерных и морских популяций ракообразных *Mysis relicta*. О функциях кальциевой сигнализации сообщалось Э. Карафоли.

Были заслушаны сообщения, посвященные мембранологии (одна из пленарных сессий).

Нужно указать на то, что многие из рассматривавшихся на конференции направлений находились в

сфере научных интересов Ю.А. Овчинникова; больше того, часть из них относится к его первопроходческим разработкам.

По традиции состоялся конкурс молодых ученых, который вызвал большой интерес среди специалистов. Был проведен соответствующий конкурсный отбор и заслушаны личные сообщения о наиболее перспективных исследованиях.

Материалы конференции размещены на сайте <http://www.ibch.ru/press/events/conferences/910>.

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 правила.

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.
13. Имеется электронный архив журнала на сайте Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (www.biorosinfo.ru).



Подписано к печати 30.09.14
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 5,0. Тираж 1000 экз.

ООО «Издательство «БИОСФЕРА»
109147 Москва, ул. Марксистская, 20, стр. 8
Тел.: +7 (495) 763-18-41; E-mail: biosphere@biorosinfo.ru

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