

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

**Научно-практический журнал**

**Основан в 2005 году**

**Главный редактор**

Р.Г. Васильов

**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 (Пуцзино), 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 (Пуцзино), 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**

<b>Колонка главного редактора</b> К читателям. <i>Р.Г. Васильев</i> .....	4
<b>Оригинальные статьи</b>	
Модель тест-системы на основе эмбриональных стволовых клеток для скрининга перспективных лекарственных средств. <i>С.А. Антонов, А.Г. Кобылянский, Л.А. Андреева, И.А. Гривенников, Н.Ф. Мясоедов</i> .....	5
Разработка способа количественной оценки содержания фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» в рабическом антигене. <i>Ж.В. Матвеева, Е.Г. Абрамова, С.В. Генералов, Н.В. Майоров</i> .....	12
Биопрепарат «Универсал» и микроводоросли в условиях углеводородного загрязнения. <i>Т.Н. Щемелинина, М.Ю. Маркарова, Н.В. Злобина, Ж.Л. Пантюхина</i> .....	18
Значение метода электрофоретической подвижности эритроцитов для обоснования комплексного лечения хронической ишемии головного мозга с применением антистрессорной терапии. <i>Е.А. Антипенко, А.В. Дерюгина</i> .....	23
<b>Краткие сообщения</b>	
Молочнокислые микроорганизмы в технологии продуктов с использованием сырья морского генеза. <i>С.В. Журавлева, Т.М. Бойцова, Ж.Г. Прокопец</i> .....	28
Селективные системы с ионами вольфрама – W(VI) и ванадия – V(V) в клеточной селекции растений. <i>Л.Е. Сергеева, С.И. Михальская, Е.Н. Тищенко</i> .....	32
<b>Обзоры</b>	
Биоэкономика в России: следование шаблонам или реальный потенциал комплексного развития? <i>Т.Н. Гаева, Р.Г. Васильев</i> .....	35
Оптимизация путей транспорта глюкозы и синтеза щавелевоуксусной кислоты при конструировании бактериальных продуцентов треонина. <i>Д.М. Бубнов, Т.В. Юзбашев, И.Т. Гвилава, С.П. Синюкий</i> .....	43
Молекулярно-биологические основы этиопатогенеза и диагностики инфекции, вызванной вирусом папилломы человека: значение для реализации программ профилактики рака шейки матки. <i>А.Т. Асратов, А.А. Костин, О.И. Трушина, А.Д. Каприн</i> .....	53
<b>Страницы истории</b>	
К 100-летию со дня рождения Ренато Дульбекко – выдающегося молекулярного биолога XX столетия. <i>В.С. Воробьев</i> .....	65
<b>Хроника</b>	
События 2014 года .....	71
<b>Правила для авторов</b> .....	78

**CONTENTS**

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

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

**Original articles**

A model of the embryonic stem cell-based test-system for screening  
of prospective drugs.

*S.A. Antonov, A.G. Kobylansky, L.A. Andreeva, I.A. Grivennikov, N.F. Myasoedov* ..... 5

Development of a quantitative evaluation of the content of fixed rabies virus strain «Moscow 3253» in  
rabies antigen.

*Zh.V. Matveeva, E.G. Abramova, S.V. Generalov, N.V. Mayorov* ..... 12

Effect of bioproduct «Universal» and microalgae in condition of hydrocarbon contamination.

*T.N. Schemelinina, M.Y. Markarova, N.V. Zlobina, J.L. Pantyuhina* ..... 18

The value of the electrophoretic mobility of erythrocytes to justify the complex treatment of chronic cerebral  
ischemia using antistress therapy.

*E.A. Antipenko, A.V. Deryugina* ..... 23

**Short communications**

Lactic acid bacteria in food technology using raw materials of marine origin.

*S.V. Zhuravleva, T.M. Boytsova, J.G. Prokopets* ..... 28

Selective systems with tungstate – W(VI) and vanadium – V(V) ions in the plant cell selection.

*L.E. Sergeeva, S.I. Mykhalska, E.N. Tishchenko* ..... 32

**Reviews**

Bioeconomy in Russia: the templates or the real potential of integrated development?

*T.N. Gaeva, R.G. Vasilov* ..... 35

Optimization of glucose transport pathways and oxaloacetic acid synthesis in designing threonine producing  
bacterial strains.

*D.M. Bubnov, T.V. Yuzbashev, I.T. Gvilava, S.P. Sineoky* ..... 43

Molecular biological basis of etiopathogenesis and diagnostics of human papilloma virus infection: significance  
for realisation of programs to prevent cervical cancer.

*A.T. Asratov, A.A. Kostin, O.I. Trushina, A.D. Kaprin* ..... 53

**Pages of history**

The 100<sup>th</sup> anniversary of Renato Dulbecco – eminent molecular biologist of XX century.

*V.S. Vorobyev* ..... 65

**The chronicle**

Events in 2014 ..... 71

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

## К читателям

Во втором номере за 2014 год сделана подборка разноплановых работ: от скрининга лекарственных средств до проблем формирования биорегионов в России.

Группа исследователей из Института молекулярной генетики РАН (Антонов С.А., Гривенников И.А. и др.) продолжила серию своих работ на эмбриональных стволовых клетках как модельных системах скрининга лекарственных препаратов.

Сотрудники Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» из Саратова Ж.В. Матвеева и др. сообщают о разработке метода количественной оценки содержания фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» в рабическом антигене.

Т.Н. Щемелинина с коллегами из Института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН (Сыктывкар) продемонстрировали эффективность комплексного биологического агента для очистки нефтезагрязненных вод на базе биопрепарата «Универсал» и микроводоросли *Chlorella vulgaris*.

Нижегородские авторы (Антипенко Е.А., Дерюгина А.В.) применили метод электрофоретической подвижности эритроцитов с целью обоснования антистрессорной терапии в комплексном лечении пациентов с хронической ишемией головного мозга.

С.В. Журавлева, Т.М. Бойцова, Ж.Г. Прокопец из Дальневосточного федерального университета (Владивосток) представили данные по изучению использования молочнокислых бактерий *Lactobacterium acidophilum* в технологии изготовления рыбных паст.

Исследователи из Киевского института физиологии растений и генетики НАН Украины Л.Е. Сергеева, С.И. Михальская, Е.Н. Тищенко предложили метод применения в клеточной селекции ионов вольфрамата и ванадата для отбора устойчивых линий клеток растений.

В номере собрано несколько обзоров. Т.Н. Гаева и Р.Г. Василов (Москва) обсудили проблемы развития в России биоэкономики как эффективного макроэкономического механизма, позволяющего качественно изменить экономику в целом на базе высоких ресурсосберегающих биотехнологий, сохранения экологии и социальной направленности. Сотрудники ВНИИгенетика Д.М. Бубнов и др. проанализировали оптимизацию путей транспорта глюкозы и синтеза щавелевоуксусной кислоты при конструировании бактериальных продуцентов треонина. А.Т. Асратов, А.А. Костин, О.И. Трушина, А.Д. Каприн (Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена, Российский университет дружбы народов) рассмотрели перспективы широкого использования молекулярно-генетических методов в скрининговых программах рака шейки матки.

Историческая рубрика посвящена 100-летию со дня рождения известного молекулярного биолога, лауреата Нобелевской премии Ренато Дульбекко. В заключение приводится информация о Втором экономическом форуме в Кирове «БиоКиров-2014» и о ходе реализации Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года («БИО-2020»).

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

## МОДЕЛЬ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ СКРИНИНГА ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

С.А. АНТОНОВ\*, А.Г. КОБЫЛЯНСКИЙ, Л.А. АНДРЕЕВА,  
И.А. ГРИВЕННИКОВ, Н.Ф. МЯСОЕДОВ

*ФГБУН «Институт молекулярной генетики РАН», Москва*

Разработка *in vitro* методов, основанных на культурах клеток млекопитающих, для высокопродуктивного скрининга фармацевтических препаратов является актуальной задачей. В настоящей работе предложена модель тест-системы для выявления потенциального влияния исследуемых соединений на ранние этапы эмбрионального развития. В этой тест-системе оценивается действие изучаемых соединений на выживаемость и пролиферацию эмбриональных стволовых клеток мыши и их дифференцированных производных, в частности, нейральных предшественников. Жизнеспособность клеток, культивируемых в присутствии изучаемых соединений, оценивается с помощью МТТ-анализа и иммунофлуоресцентной микроскопии. Полученные данные позволяют сделать предварительное заключение о наличии у исследуемых соединений эмбриотоксических и тератогенных свойств. С использованием разработанной модели проведен анализ влияния ряда пептидов с общей последовательностью Pro-Gly-Pro, а также известных факторов роста FGF2 и NGF на выживаемость, пролиферацию и начальные этапы дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в нейральном направлении.

*Ключевые слова:* эмбриональные стволовые клетки, тест-системы, моделирование, лекарственные средства, скрининг.

### Введение

В настоящее время ведется активный поиск альтернатив экспериментальным моделям на животных в доклинических испытаниях потенциальных лекарственных средств. Применение лабораторных животных в фармакологическом скрининге требует больших финансовых и трудовых затрат и, кроме этого, подвергается критике с точки зрения биоэтики (Коваленко В.Н., 2002 [3]; Giacomotto J., 2010 [9]). Использование тест-систем, основанных на культурах клеток млекопитающих и человека, открывает значительные возможности для повышения эффективности скрининга исследуемых соединений. Наиболее удобную модель для выявления эмбриотоксических и тератогенных свойств у тестируемых веществ представляют эмбриональные стволовые (ЭС) клетки (Rohwedel J., 2001 [15]; Genschow E., 2002 [8]; Wobus A., 2011 [19]).

ЭС клетки — это плюрипотентные клетки, которые могут неограниченно долго поддерживаться в культуре *in vitro* с сохранением нормального кариотипа [19].

Кроме того, ЭС клетки могут быть подвергнуты генетическим модификациям, что позволяет создавать на их основе модели различных наследственных метаболических нарушений (Гривенников И.А., 2008). Эти свойства делают ЭС клетки удобной моделью для изучения начальных стадий эмбрионального развития *in vitro* и выявления соединений, влияющих на данные процессы. На сегодняшний день ЭС клетки мыши и человека все шире используются в доклинических исследованиях новых лекарственных средств для оценки их эмбриотоксичности и тератогенности (Laustriat D., 2010 [13]; Krug A., 2011 [11]; Wobus A., 2011 [19]).

Ранее нами была предложена тест-система *in vitro* для выявления нейропротективных свойств исследуемых соединений на основе первичных культур нейральных клеток (Гривенников И.А. и др., 2011) [2]. В этой работе нами была использована модель тест-системы на основе ЭС клеток мыши для обнаружения у потенциальных лекарственных соединений способности влиять на процессы раннего эмбрионального развития *in vitro*. Система включает в себя оценку действия исследуемых веществ на пролиферацию, выживаемость ЭС клеток, а также их производных. В этой модели тест-системы оценивалась дифференцировка ЭС клеток в нейральные предшественники, выявляемые по экспрессии специфических маркеров. Совокупная оценка указанных параметров по-

© 2014 г. Антонов С.А., Кобылянский А.Г., Андреева Л.А., Гривенников И.А., Мясоедов Н.Ф.

\* Автор для переписки:

Антонов Станислав Анатольевич, мл.н.с., ИМГ РАН  
123182 Москва, площадь академика И.В. Курчатова, 2

зволяет сделать заключение о наличии у анализируемых соединений эмбриотоксических или тератогенных свойств. С применением данной модели тест-системы нами была проведена комплексная оценка действия коротких пептидов с общей последовательностью RGR на пролиферацию, выживаемость и ранние этапы дифференцировки ЭС клеток. Ранее было показано, что эти соединения способны влиять на выживаемость и функциональную активность клеток нервной системы (Гривенников И.А. и др., 2011 [2]; Stavchansky V.V., 2011 [18]). Кроме того, была сформулирована концепция регуляторной роли ряда пролинсодержащих коротких пептидов, заключающаяся в воздействии этих соединений на регуляцию системы гемостаза и инсулярной системы организма (Ляпина Л.А., 2013 [4]; Мясоедов Н.Ф., 2013 [5]). Поскольку данные соединения могут быть в дальнейшем использованы в качестве фармацевтических препаратов, представлялось интересным оценить возможное наличие у этих соединений эмбриотоксических и тератогенных свойств.

В настоящей работе было изучено влияние пептидов: Pro-Gly-Pro, Arg-Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro-Leu на процессы пролиферативной активности и жизнеспособности ЭС клеток, а также на начальные этапы дифференцировки их в нейральном направлении. В качестве контрольного соединения в экспериментах был использован фармацевтический препарат семакс (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro), обладающий ноотропными свойствами (Medvedeva E.V. et al., 2014) [13].

### Материалы и методы

*Культивирование ЭС клеток.* ЭС клетки мыши линии R1 (любезно предоставленные A. Nagy, Mount Sinai Hospital, Toronto, Canada) культивировались в 35 мм чашках Петри (Nunc, ЕС), покрытых 0,1% желатином (Sigma, ЕС) в среде альфа-МЕМ с 15% фетальной бычьей сыворотки (Life Technologies, США), содержащей 0,1 мМ смесь заменимых аминокислот МЕМ, витаминов МЕМ (Life Technologies, США), 1 мМ пируват натрия, 0,1 мМ меркаптоэтанол (Sigma, ЕС), 20 мкг/мл гентамицина (Панэко, Россия) и 1000 ед./мл рекомбинантного фактора, ингибирующего лейкемию (LIF, R&D Systems, ЕС). Клетки культивировались в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С. Пассирование проводилось каждые три дня, на чашку высевалось 6 × 10<sup>4</sup> клеток в 2 мл среды.

*Дифференцировка ЭС клеток.* Для индукции дифференцировки в стандартных условиях колонии ЭС клеток диссоциировали 0,05% трипсином в растворе

Версена и готовили суспензию с концентрацией 5 × 10<sup>4</sup> клеток/мл. Полученную суспензию наносили в объеме 20 мкл на поверхность крышек чашек Петри (Nunc, ЕС) 60 мм (метод «висячей капли»). Для предотвращения изменения объема капель за счет испарения в чашки наливали стерильную воду. Капли с клетками инкубировали на крышках 96 ч, после чего сформированные эмбрионидные тела (ЭТ) переносили в среду DMEM-F12 с добавками среды N2 (Life Technologies, США) и исследуемыми веществами в заданной концентрации или без них (контроль). ЭТ высевались в 24 луночные планшеты, по 1 на лунку. В лунки предварительно помещались покровные стекла 12 мм, покрытые 0,05% ламином (Панэко, Россия). В качестве исследуемых соединений к культурам дифференцирующихся ЭС клеток добавлялись соответствующие пептиды или рекомбинантные факторы NGF и FGF2 (Peprotech, Китай).

*Оценка скорости пролиферации ЭС клеток.* Пролиферативная активность ЭС клеток оценивалась с помощью МТТ-анализа (Sherman et al., 1994). Для оценки влияния на пролиферативную активность ЭС клеток исследуемые вещества добавляли в заданной концентрации в среду с нормальным содержанием (15%) сыворотки. Для изучения влияния исследуемых соединений на выживаемость клеток была использована среда с пониженным содержанием сыворотки (5%). Клетки культивировали в 96-луночных планшетах («Nunc», ЕС) в присутствии или в отсутствии (контроль) исследуемых соединений в течение 72 часов, после чего проводили МТТ-анализ. После инкубации в лунки добавляли раствор МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5 дифенилтетразолиум бромид) до конечной концентрации 1 мг/мл. Клетки инкубировали при 37 °С 2 ч., затем среду удаляли, а осадок формазана растворяли в 0,1 N HCl в изопропанол в течение 1 ч. Далее в лунках микропланшетов измеряли оптическую плотность раствора формазана с помощью спектрофотометра при длине волны 570 нм.

*Иммунофлуоресцентное окрашивание клеточных культур.* Численность и фенотип дифференцирующихся ЭС клеток оценивали с помощью фазово-контрастной и иммунофлуоресцентной микроскопии. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили с помощью антител к белкам нестину (Millipore, США) и SOX1 (Abcam, Англия), специфичных для дифференцирующихся нейральных предшественников. Соэкспрессия SOX1 и нестина в характерна для ранних нейроэпителиальных клеток. В работе использовались вторичные антитела козы против иммуноглобулинов кролика и мыши, конъюгированные соответственно с

флуоресцентными красителями Alexa 546 и Alexa 488 (Life Technologies, США).

Культуры ЭС клеток, дифференцирующихся в описанных выше условиях, фиксировались 4% формалином в фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение 1 ч. Клетки промывали три раза PBS и неспецифическое связывание блокировали PBS с 0,05% Тритон X100 (Sigma, ЕС) и 1% сыворотки того же вида, в котором получали первичные антитела. Клетки инкубировали в течение 12 ч при 4 °С с первичными антителами в рекомендуемом производителем разведении и затем промывали 3 раза PBS. После этого клетки инкубировали 3 ч с растворами вторичных антител в указанных производителем разведениях. Ядра клеток окрашивали 50 нМ р-ром DAPI (Life Technologies, США). Препараты исследовались с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Imager.Z1 (Zeiss, ЕС). Анализ изображений осуществлялся с помощью программного пакета NIH Image.

*Исследование действия пептидов на пролиферативную активность и выживаемость ЭС клеток.* Используя предложенную нами модель тест-системы, оценивали влияние коротких пептидов с общей формулой Pro-Gly-Pro (PGP, RPPG, PGPL) и семакса (MQHFPGP) на рост ЭС клеток в нормальных условиях и в среде с пониженным содержанием сыворотки. Для оценки влияния пептидов на пролиферацию и выживаемость недифференцированных ЭС клеток клетки высевали на 96-луночные планшеты, покрытые 0,1% желатином, и через 72 ч после добавления численность конечной популяции оценивалась с помощью МТТ-теста. Действие пептидов и семакса на пролиферацию и выживаемость недифференцированных ЭС клеток изучалось в диапазоне концентраций 0,1–10 мкМ. Пролиферацию ЭС клеток оценивали в среде с 10% содержанием FBS. Выживаемость ЭС клеток в условиях трофического голодания исследовали в среде с 5% FBS. Каждый вариант опыта оценивали, как минимум, в 6 повторностях. В качестве отрицательного контроля использовали цитостатический препарат неомицин в концентрации 20–100 мкг/мл.

*Изучение влияния действия пептидов и рекомбинантных факторов роста на дифференцировку ЭС клеток.* В данной работе исследовалось действие перечисленных выше пептидов в диапазоне концентраций 1–10 мкМ на пролиферацию общей популяции дифференцированных ЭС клеток и численность SOX1+/Nestin+ нейроэпителиальных клеток. Оценка данных параметров позволяет сделать общее заключение о наличии тератогенных свойств у изучаемых соединений,

а также способности специфически влиять на развитие эмбриональной нервной системы. Дифференцировку ЭС клеток осуществляли через формирование эмбрионидных тел, как описано выше. Сформированные эмбрионидные тела высевали в среду с добавлением изучаемых пептидов в заданной концентрации. Дифференцировка с изучаемыми соединениями проводилась в бессывороточной среде детерминированного состава DMEM-F12 (Life Technologies, США). В качестве положительного контроля в работе были использованы рекомбинантные фактор роста нервов (NGF) (Peprotech, Китай) и фактор роста фибробластов (FGF2) (Панэко, Россия), для которых известна способность влиять на рост и дифференцировку ЭС клеток мыши. NGF и FGF2 добавлялись в среду в концентрации 100 и 10 нг/мл, соответственно (Schuldiner M., 2000) [16].

*Статистическая обработка результатов.* Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Sigma Plot 11» (Systat Software Inc, США). Достоверность различий сравниваемых выборок при анализе данных оценивали с использованием t критерия Стьюдента. Достоверными считались значимости различий при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Для оценки безопасности разрабатываемых лекарственных средств нами предложена модель тест-системы, основанная на применении ЭС клеток мыши. С помощью предложенной модели тест-системы была проведена оценка действия пептидов с общей последовательностью Pro-Gly-Pro на пролиферацию, выживаемость и ранние этапы нейральной дифференцировки ЭС клеток. Оценка этих параметров позволяет сделать предварительное заключение о наличии или отсутствии у анализируемых веществ эмбриотоксических и тератогенных свойств. Выживаемость и пролиферация недифференцированных ЭС клеток оценивалась с помощью МТТ-анализа (Sherman et al., 1994). Оценка дифференцировки ЭС клеток в нейральные предшественники анализировалась по экспрессии специфических маркеров SOX1 и нестина с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии.

### **Действие пептидов с общей последовательностью Pro-Gly-Pro на пролиферативную активность ЭС клеток**

Нами было изучено действие коротких пептидов Pro-Gly-Pro, Arg-Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro-Leu и семакса (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) в концентрации 0,1–10 мкМ на пролиферативную активность

и выживаемость недифференцированных ЭС клеток мыши в стандартных условиях культивирования. В качестве контроля использовался цитостатический препарат неомицин в концентрациях 20, 40 и 100 мкг/мл. В концентрации 100 мкг/мл и времени экспозиции 72 часа неомицин вызывал практически полную гибель недифференцированных ЭС клеток. Изученные пептидные препараты в указанных концентрациях не оказывали заметного влияния на скорость пролиферации ЭС клеток. Это позволяет сделать заключение о вероятном отсутствии воздействия изучаемых пептидных препаратов на ранние этапы развития эмбриона (Рис. 1А).

**Действие изучаемых пептидов с общей последовательностью RGR на выживаемость ЭС клеток**

Исследование способности пептидных препаратов предотвращать гибель ЭС клеток в условиях дефицита трофических факторов (среда с пониженным содержанием сыворотки) не выявило достоверных различий по сравнению с контролем (рис. 1Б). В то же время известный цитотоксический агент неомицин заметно подавлял как пролиферацию, так и жизнеспособность культивируемых ЭС клеток.

**Действие изучаемых пептидов с общей последовательностью RGR на начальные стадии дифференцировки ЭС клеток**

Была проведена оценка воздействия пептидов с общей последовательностью RGR на количество нейральных предшественников и общую численность клеток в дифференцирующихся эмбрионидных телах, сформированных ЭС клетками. ЭТ культивировались в адherentных условиях в течение 4 дней в среде с добавлением изучаемых соединений в указанных концентрациях, после чего клетки фиксировались и с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии проводился анализ дифференцирующихся популяций. В качестве контроля использовались факторы FGF2 и NGF, для которых была показана способность влиять на пролиферацию ЭС клеток (Moscatelli I. et al., 2009) [14] и их нейральных производных (Solozobova V. et al., 2012) [17]. Поскольку ранее было показано синергическое действие сочетания FGF2 и NGF на пролиферацию нейральных предшественников, получаемых из фетальной ткани (Cattaneo E. et al., 1990) [7], целесообразно было изучить влияние сочетания этих факторов на пролиферацию нейральных предшественников, образующихся из ЭС клеток. Общая численность популяции живых клеток оценивалась по числу ядер, окрашенных DAPI, а численность нейральных производных — по

количеству клеток, иммунопозитивных к белкам SOX1 и нестину (Nestin).

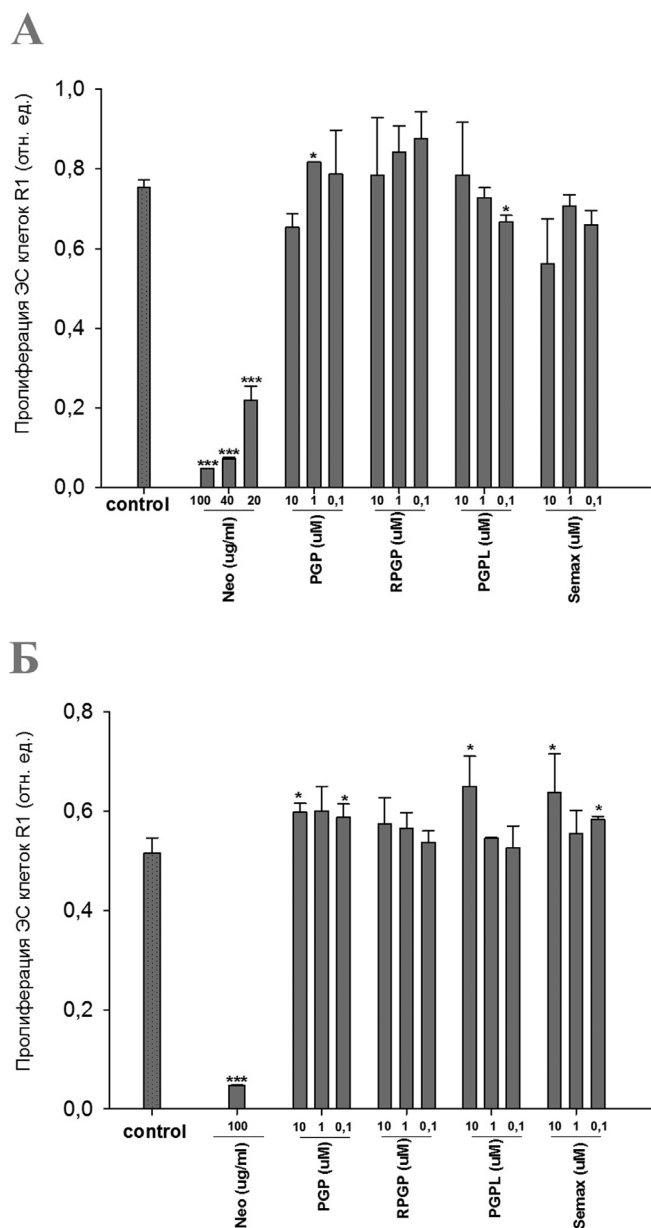


Рис. 1. Влияние пептидов с общей последовательностью Pro-Gly-Pro и семакса на пролиферацию и выживаемость недифференцированных ЭС клеток мыши. А — рост клеток в стандартной среде для ЭС клеток с добавлением указанных соединений. Б — рост клеток в среде с пониженным содержанием FBS. Результаты представлены в виде: среднее + ошибка среднего. Контроль — среда без добавок, нео — неомицин, n=6, \* p<0,05

Пептиды с общей последовательностью Pro-Gly-Pro не влияли на скорость пролиферации общей популяции дифференцированных клеток, образующихся из ЭТ, сформированных ЭС клетками. Данные соединения так-



же не оказывали влияния на образование и пролиферацию нейральных предшественников в дифференцирующихся ЭТ (рис. 2).

Рекомбинантный фактор роста FGF2 заметно повышал скорость пролиферации клеток в дифференцирующихся ЭТ и, в частности, нейральных предшественников. Фактор роста NGF не оказывал заметного влияния на пролиферативную активность и образование нейральных предшественников в дифференцирующихся ЭТ. Сочетание двух факторов снижало общую численность популяции дифференцирующихся ЭС клеток по сравнению с контролем, однако отличие не было достоверным (см. рис. 2). Таким образом, NGF уменьшал эффект усиления пролиферации нейральных предшественников и общую численность дифференцированных клеток, индуцированный FGF2.

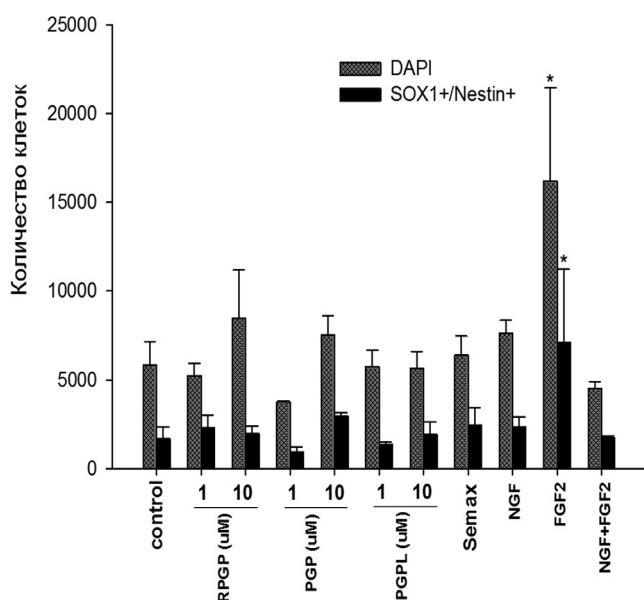


Рис. 2. Влияние пептидов с общей последовательностью RPPG, факторов роста FGF2, NGF и их сочетания на численность общей популяции дифференцированных ЭС клеток и нейральных предшественников, образующихся в этих популяциях. Действие пептидов изучалось в диапазоне концентраций 1–10 мкМ и семакса в концентрации 10 мкМ. В качестве положительного контроля в работе были применены рекомбинантные факторы роста NGF и FGF2 в концентрации 100 и 10 нг/мл, соответственно. Результаты представлены в виде: среднее ± ошибка среднего,  $n=4$

### Обсуждение

Начальные стадии дифференцировки эмбриональных стволовых клеток *in vitro* рассматривают в качестве

уникальных трехмерных моделей раннего развития млекопитающих для фундаментальных, фармакологических и токсикологических исследований (Гордеева О.Ф., 2013) [1]. Это свойство делает ЭС клетки удобной основой для тест-систем, предназначенных для оценки эмбриотоксических и тератогенных свойств перспективных лекарственных соединений.

Эмбриональная нейротоксичность и многие формы репродуктивной токсичности часто возникают в виде функциональных нарушений в клетках, которые выражаются не их гибелью, а изменениями, относящимися к процессу дифференцировки или изменениям межклеточных контактов. Исследования в области эмбриональной нейротоксичности и репродуктивной токсичности нуждаются в создании *in vitro* тест-систем для идентификации в клетках изменений экспрессии генов, индуцированных воздействием токсичных соединений [11]. Наиболее высокой чувствительностью к повреждающим агентам человеческие эмбрионы обладают во время имплантации (первый критический период) и во время плацентации (второй критический период). Повреждающие факторы различной природы могут оказывать на эмбрионы эмбриотоксическое или тератогенное действие, в зависимости от периода развития. Эмбриотоксическое действие повреждающих факторов характерно для первого критического периода, тератогенное — для второго [19].

В предложенной модели тест-системы оценивали влияние изучаемых соединений на процессы пролиферации и выживаемости ЭС клеток, а также их дифференцировки в нейральные предшественники *in vitro*. Полученные в результате работы данные свидетельствуют о том, что разработанная модель позволяет выявлять соединения, обладающие потенциальным эмбриотоксическим и тератогенным действием. Прототипом для представленной модели послужила тест-система, одобренная ЕСВАМ для применения в фармакологических испытаниях [8, 11]. Помимо предложенных ранее параметров роста недифференцированных ЭС клеток, в нашей модели также оценивается пролиферация специфических дифференцированных производных. Использование стандартных методов молекулярной биологии, таких как МТТ-анализ, иммунофлуоресцентная микроскопия, дает возможность получить значительный объем данных, характеризующих свойства интересующих соединений.

Благодаря плюрипотентности ЭС клетки позволяют изучать различные этапы клеточной дифференцировки *in vitro*. Сравнение процессов дифференцировки ЭС

клеток в стандартизованных условиях в присутствии и в отсутствие изучаемых веществ обеспечивает выявление потенциальных цитотоксических или тератогенных эффектов этих соединений [15, 19]. Создание подобных клеточных тест-систем скрининга особенно важно для сокращения объема исследований, проводимых на животных, в частности на ранних эмбрионах (Adler S. et al., 2008 [6], Giacomotto J. et al., 2010 [9], Greek R., 2013 [10]).

Для практического применения клеточных тест-систем в доклинических испытаниях исследуемых веществ необходимо определить их прогностическую эффективность. С этой целью следует оценивать способность разработанной модели тест-системы выявлять побочные эффекты у ряда известных токсичных соединений.

Для пептидных препаратов с общей последовательностью Pro-Gly-Pro было показано, что эти соединения не влияют на скорость пролиферации недифференцированных ЭС клеток и на выживаемость ЭС клеток в среде с пониженным содержанием сыворотки. Испытанные препараты также не оказывали заметного влияния на рост дифференцированных производных ЭС клеток, в частности, нейральных предшественников.

### Заключение

На основе ЭС клеток мышцы разработана модель тест-системы для испытания *in vitro* соединений, представляющих фармакологический интерес. Модель позволяет определять их токсичность для недифференцированных ЭС клеток или способность стимулировать их рост. Она также открывает возможность оценить влияние соединений на дифференцировку ЭС клеток в нейральном направлении, для выявления потенциального тератогенного эффекта. В представленной работе отработан метод оценки способности тестируемых соединений влиять на процесс нейральной дифференцировки — образование нейральных предшественников, выявляемых по наличию экспрессии специфических маркеров. Разработанная система представляется экономичной альтернативой испытаниям на ранних эмбрионах животных.

Работа поддержана грантом РФФИ № 12-08-00014-а и выполнена с использованием оборудования ЦКП «Центр клеточных и генных технологий» ИМГ РАН.

### Литература

1. Гордеева О.Ф. Цитотоксические эффекты этопозида на разных стадиях дифференцировки эмбрионных тел, сформированных эмбриональными стволовыми клетками мышцы // Онтогенез. — 2013. — Т. 44. — № 6. — С. 381–388.
2. Гривенников И.А., Долотов О.В., Иноземцева Л.С., Антонов С.А., Кобылянский А.Г., Мясоедов Н.Ф. Применение первичных культур нервных и глиальных клеток млекопитающих для отбора соединений с нейропротекторной активностью // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2011. — Т. 7. — № 2. — С. 24–31.
3. Коваленко В.Н. Альтернативные методы в доклиническом изучении токсичности лекарственных средств // Современные проблемы токсикологии — 2002. — № 4. — С. 14–18.
4. Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Григорьева М.Е., Шубина Т.А., Андреева Л.А. Современная концепция регуляторной роли пептидов гликопролинового ряда в коррекции функции системы гемостаза при развитии сахарного диабета // Известия РАН. Серия биологическая. — 2013. — № 4. — С. 453–462.
5. Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А., Ляпина Л.А., Шубина Т.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю. Коррекция нарушений функций противосвертывающей и инсулярной систем организма регуляторным пептидом Leu-Pro-Gly-Pro // Известия РАН. Серия биологическая. — 2013. — № 3. — С. 1–4.
6. Adler S., Pellizzer C., Hareng L., Hartung T., Bremer S. First steps in establishing a developmental toxicity test method based on human embryonic stem cells // Toxicology in Vitro. — 2008. — Т. 22. — No. 1. — P. 200–211.
7. Cattaneo E., McKay R. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor // Nature. — 1990 Oct 25. — Vol. 347(6295). — P. 762–765.
8. Genschow E., Spielmann H., Scholz G., Seiler A., Brown N., Piersma A., et al. The ECVAM international validation study on *in vitro* embryotoxicity tests: Results of the definitive phase and evaluation of prediction models. European centre for the validation of alternative methods // Altern. Lab. Anim. — 2002. — Vol. 30. — P. 151–176.
9. Giacomotto J., Segalat L. High-throughput screening and small animal models, where are we? // Br. J. Pharmacol. — 2010. — Vol. 160(2). — P. 204–216.
10. Greek R. Animal models in drug development / New Insights into Toxicity and Drug Testing, Dr. Sivakumar Gowder (Ed.). — InTech, 2013.
11. Krug A., Kolde R., Gaspar J., Rempel E., Balmer N., Meganathan K., Vojnits K., Baquie M., Waldmann T., Ensenat-Waser R., Jagtap S., Evans R., Julien S., Peterson H., Zagoura D., Kadereit S., Gerhard D., Sofiriadou I., Heke M., Natarajan K., Henry M., Winkler J., Marchan

- R., Stoppini L., Bosgra S., Westerhout J., Verwei M., Vilo J., Kortenkamp A., Hescheler J., Hothorn L., Bremer S., van Thriel C., Krause K., Hengstler J., Rahnenfuhrer J., Leist M., Sachinidis A. Human embryonic stem cell-derived test systems for developmental neurotoxicity: a transcriptomics approach // *Arch. Toxicol.* – 2013. – Vol. 87(1). – P. 123–143.
12. Laustriat D., Gide J., Peschanski M. Human pluripotent stem cells in drug discovery and predictive toxicology // *Biochem. Soc. Trans.* – 2010. – T. 38. – No. 4. – P. 1051–1057.
13. Medvedeva E.V., Dmitrieva V.G., Povarova O.V., Limborska S.A., Skvortsova V.I., Myasoedov N.F., Dergunova L.V. The peptide semax affects the expression of genes related to the immune and vascular systems in rat brain focal ischemia: genome-wide transcriptional analysis // *BMC Genomics.* – 2014 Mar 24. – Vol. 15(1). – P. 228. doi: 10.1186/1471-2164-15-228.
14. Moscatelli I., Pierantozzi E., Camaioni A., Siracusa G., Campagnolo L.  $\rho 75$  neurotrophin receptor is involved in proliferation of undifferentiated mouse embryonic stem cells // *Exp. Cell Res.* – 2009 Nov 1. – Vol. 315(18). – P. 3220–3232.
15. Rohwedel J., Guan K., Hegert C., Wobus A.M. Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects // *Toxicol. in Vitro.* – 2001. – Vol. 15. – No. 6. – P. 741–753.
16. Schuldiner M., Yanuka O., Itskovitz-Eldor J., Melton D.A., Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells // *PNAS.* – 2000 Oct 10. – Vol. 97(21). – P. 11307–113012.
17. Solozobova V., Wyvekens N., Pruszek J. Lessons from the embryonic neural stem cell niche for neural lineage differentiation of pluripotent stem cells // *Stem Cell Rev.* – 2012 Sep. – Vol. 8(3). – P. 813–829.
18. Stavchansky V.V., Yuzhakov V.V., Botsina A.Y., Skvortsova V.I., Bondurko L.N., Tsyganova M.G., Limborska S.A., Myasoedov N.F., Dergunova L.V. The effect of Semax and its C-end peptide PGP on the morphology and proliferative activity of rat brain cells during experimental ischemia: a pilot study // *J. Mol. Neurosci.* – 2011 Oct. – Vol. 45(2). – P. 177–185.
19. Wobus A., Loeser P. Present state and future perspectives of using pluripotent stem cells in toxicology research // *Arch. Toxicol.* – 2011. – Vol. 85(2). – P. 79–117.

#### Список сокращений

НП – нейральные предшественники  
ЭС клетки – эмбриональные стволовые клетки  
ЭТ – эмбрионидные тела  
DAPI – 4', 6-диамидино-2-фенилиндола  
FBS – фетальная бычья сыворотка  
FGF2 – фактор роста фибробластов 2  
NGF – фактор роста нервов  
PBS – фосфатно-солевой буфер

## A MODEL OF THE EMBRYONIC STEM CELL-BASED TEST-SYSTEM FOR SCREENING OF PROSPECTIVE DRUGS

S.A. ANTONOV, A.G. KOBLYANSKY, L.A. ANDREEVA, I.A. GRIVENNIKOV, N.F. MYASOEDOV

*Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow*

The development of in vitro mammalian cell-based methods for high-throughput screening of pharmaceutical preparations represents an actual problem. In current paper we describe the model of a test-system for assaying the influence of drugs on early stages of embryonic development. The current test-system includes evaluation of survival and proliferation of murine embryonic stem cells as well as their differentiation into neural precursors cells. The cell survival in presence of investigated compounds is estimated by MTT-assay and fluorescent microscopy. These tests are used to predict a potential embryotoxic or teratogenic effect of a studied compound. Using this test-system we have assayed the effect of several peptides with a common Pro-Gly-Pro motif, as well as known growth factors FGF2 and NGF on survival, proliferation and early neural differentiation of embryonic stem cells.

*Keywords:* embryonic stem cells, test-system, modeling, drugs, screening.

## РАЗРАБОТКА СПОСОБА КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ ФИКСИРОВАННОГО ВИРУСА БЕШЕНСТВА ШТАММА «МОСКВА 3253» В РАБИЧЕСКОМ АНТИГЕНЕ

Ж.В. МАТВЕЕВА\*, Е.Г. АБРАМОВА, С.В. ГЕНЕРАЛОВ, Н.В. МАЙОРОВ

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

Разработана количественная ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов для определения содержания фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» в органо-тканевом антигене, используемом для иммунизации продуцентов антирабической сыворотки. Для количественной ПЦР подобраны ДНК-мишень, специфичные праймеры и зонд формата TaqMan, ПЦР-стандарты. Оптимизированы условия амплификации, концентрации подобранных праймеров, зонда и ПЦР-стандартов.

**Ключевые слова:** ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов, фиксированный вирус бешенства, рабический антиген.

### Введение

Вирус бешенства способен вызвать у человека и животных неизлечимое заболевание, которое, по оценке ВОЗ, входит в группу инфекционных болезней, наносящих значительный ущерб экономике и здравоохранению [12]. Вследствие чрезвычайной опасности и абсолютной летальности вопросы профилактики бешенства после повреждения, нанесенного больным или подозрительным на бешенство животным, имеют исключительно важное значение [5, 8]. Для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей в России применяют концентрированную культуральную антирабическую вакцину в сочетании с антирабическим иммуноглобулином (АИГ). Рекомендованы к применению и зарегистрированы в Государственном Реестре лекарственных средств гомологичный АИГ (Китай, Франция) и гетерологичный АИГ из сыворотки крови лошади, единственным производителем которого в Российской Федерации является Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» [1, 12].

Важным аспектом при поиске путей совершенствования технологии производства антирабического иммуноглобулина является разработка методических подходов к количественной оценке содержания вируса в материале для иммунизации продуцентов. В настоящее время для иммунизации продуцентов используют органо-тканевый рабический антиген, представляющий собой инактивированную карболизированную 10% суспензию мозга кроликов, зараженных фиксированным вирусом бешенства штамма «Москва 3253». На данный момент уровень содержания вируса бешенства сопоставляется с объемом вводимой продуцентам мозговой суспензии. Одним из перспективных подходов к решению этого вопроса является использование количественной полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов (ПЦР-РВ).

Разработка ПЦР-РВ позволит дать количественную оценку содержания вируса бешенства в антигене для иммунизации продуцентов. Использование для ПЦР-РВ зонда, меченного флуоресцентными метками, и дополнительная амплификация количественно охарактеризованных проб даст возможность оценить уровень содержания вируса бешенства в инактивированном материале, предназначенном для иммунизации. Такой подход нашел успешное применение: для определения концентрации РНК вируса диареи крупного рогатого скота [9]; желтой геморрагической лихорадки, человеческого герпес вируса-6 и цитомегаловируса [10]; для количественной оценки антигена Е вируса клещевого энцефалита в культуре клеток [6]; для количественного

© 2014 г. Матвеева Ж.В., Абрамова Е.Г., Генералов С.В., Майоров Н.В.

\* Автор для переписки:

Матвеева Жанна Владимировна,  
к.б.н., научный сотрудник лаборатории генодиагностических препаратов,

ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»

410005 Саратов, ул. Университетская, 46

E-mail: withwonderfulsmiles@yandex.ru

определения вакцинных штаммов вирусов кори, эпидемического паротита и краснухи [3]; для идентификации генома вируса болезни Ибараки на основе ПЦР в режиме реального времени [2].

Целью настоящего исследования явилась разработка количественной ПЦР-РВ для определения содержания вируса бешенства штамма «Москва 3253» в материале для иммунизации продуцентов антирабической сыворотки.

## Материалы и методы

**Материал для исследования.** В работе использовали штамм фиксированного вируса бешенства «Москва 3253», полученный в НЦ ЭСМП (г. Москва), и рекомбинантный штамм *Escherichia coli* KM 229, полученный из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Для проверки специфичности метода применяли 10% суспензию мозга кроликов, зараженных фиксированным вирусом бешенства штамма «Москва 3253», и 10% суспензию интактного мозга кролика [7].

Инкубационный период и клиническая картина болезни, вызываемая пассированным вирусом, были типичными для фиксированного вируса: прогрессирующее расстройство координации у кроликов, наступление парезов и параличей конечностей. В работе использовали пробы вирусосодержащей мозговой суспензии кроликов, приготовленные на 4–7-е сутки после заражения животных.

Чувствительность метода оценивали, используя 10-кратные разведения вируса бешенства штамма «Москва 3253» с известным начальным титром  $5,0 \lg LD_{50}/0,2$  мл, а также по результатам количественной ПЦР-РВ на матрице последовательных десятикратных разведений сконструированной рекомбинантной плазмиды  $\rho RV_{\text{Moscow3253}}\text{-G-L}$ .

С целью оценки воспроизводимости показателей тестируемых образцов каждый эксперимент проводили в трех повторах независимыми постановками ПЦР-РВ.

**Выделение РНК и реакция обратной транскрипции.** Вирусную РНК получали методом нуклеосорбции на силикагеле. С этой целью использовали набор «РИБО-сорб» («Интерлабсервис», г. Москва) согласно инструкции производителя. Выделенную РНК использовали в качестве матрицы для синтеза первой цепи кДНК методом обратной транскрипции с помощью обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей и случайных праймеров. Реакцию обратной транс-

крипции осуществляли с помощью набора «Реверта-Л» («Интерлабсервис», г. Москва) согласно инструкции производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-технология», г. Москва). В качестве отрицательного контроля использовали 1×TE буфер, рН 8 («Amresco», США) и 10% мозговую суспензию интактного мозга кроликов.

**ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов.** Для подбора оптимальных условий проведения ПЦР использовали набор «Оптимизация ПЦР» (ЗАО «Силекс», г. Москва). Далее в ходе ряда экспериментов ПЦР-РВ были установлены оптимальный объем (25 мкл) и состав реакционной смеси с содержанием следующих компонентов: 10 ммоль каждого праймера, 5 ммоль флуоресцентного зонда, 1 ед. Taq-полимеразы, 2,5 ммоль  $MgCl_2$ , 0,2 ммоль дНТФ, кДНК матрицы. ПЦР проводили на амплификаторе RotorGene 6000 («Corbett Research», Австралия) по следующей программе: предварительная денатурация 95 °С – 5 мин.; цикл 1 (10 повторов): 95 °С – 10 с, 60 °С – 10 с, 72 °С – 10 с; цикл 2 (35 повторов): 95 °С – 10 с, 56 °С – 10 с, 72 °С – 25 с учетом флуоресценции по каналу ROX при температуре 56 °С во время второго цикла.

Учет результатов реакции осуществляли с помощью программного обеспечения прибора RotorGene 6000.

**Конструирование ПЦР-стандартов.** С целью получения ПЦР-стандартов использовали нуклеотидную последовательность фрагмента G-L области генома вируса бешенства штамма «Москва 3253» размером 881 н.п., фланкированного праймерами BeshG 5'-gacttgggtctcccgaactgggg-3' и BeshL 5'-caaaggagagtgattgattgtagtc-3' (с 5543 по 4663 нуклеотид по последовательности генома штамма вируса RV-97, GenBank NCBI № EF542830).

Клонирование ПЦР-продукта проводили с использованием набора «pGEM-T Vector Systems» («Promega», США). Очищенные ампликоны лигировали с линейной ДНК вектора pGEM-T. Компетентные клетки *E. coli* TG1 готовили кальциевым методом с последующей их трансформацией лигазной смесью [4].

Рекомбинантный штамм *E. coli* TG1  $\rho RV_{\text{Moscow3253}}\text{-G-L}$  был депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий при РосНИПЧИ «Микроб» под номером KM 229.

Полученный рекомбинантный штамм *E. coli* TG1 культивировали при 37 °С на LB агаре с добавлением ампицилина в концентрации 50 ед./мл, резистентность к ампицилину в концентрации 50 мкг/мл являлась

маркером наличия у штамма *E. coli* TG1 рекомбинантной плазмиды  $\rho RV_{\text{Moscow3253}}$  G-L. Плазмидную ДНК полученного рекомбинантного штамма выделяли из выращенной биомассы методом мембранной фильтрации с помощью набора PureYield Plasmid Miniprep System («Promega», США). Подтверждение на наличие фрагмента проводили методом ПЦР с праймерами BeshG и BeshL, специфичность оценивали секвенированием на генетическом анализаторе «SeQ 800» («Beckman Coulter», США) с использованием стандартных протоколов пробоподготовки и программного обеспечения прибора.

Плазида  $\rho RV_{\text{Moscow3253}}$  G-L с клонированным фрагментом G-L области генома фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» являлась исходным продуктом для получения ПЦР-стандартов, используемых при проведении ПЦР-РВ для определения количества вируса в органо-тканевом антигене. Значение оптической плотности очищенного препарата рекомбинантной плазмиды определяли на спектрофотометре («Biowave II», Великобритания). Полученные данные использовали для расчета концентрации плазмиды с пересчетом количества копий в 1 мл. Для постановки количественной ПЦР-РВ применяли десятикратные последовательные разведения очищенного препарата рекомбинантной плазмиды  $\rho RV_{\text{Moscow3253}}$  G-L.

### Результаты и обсуждение

Наиболее подходящим участком для выбора ДНК-мишени явилась G-L область генома вируса бешенства. С целью оценки перспективности использования этой области в качестве ДНК-мишени для разработки способа количественного определения фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» была определена нуклеотидная последовательность фрагмента данного участка генома у штамма «Москва 3253» размером 881 н.п. Анализ гомологии полученной последовательности G-L области штамма «Москва 3253» проводили с таковым у других 26 изолятов вируса бешенства с помощью алгоритма BLAST и генетической базы данных GenBank. Для сравнения были выбраны полные геномы штаммов вируса бешенства, выделенных из биологического материала от животных и человека, а также аттенуированных и вакцинных штаммов. На основании полученных результатов была выведена консенсусная последовательность фрагмента G-L области у фиксированного штамма вируса бешенства «Москва 3253», на которую были подобраны олигонуклеотидные праймеры RV5 и RV6, обеспечи-

вающие амплификацию фрагмента в пределах 436-585 и зонд формата TaqMan RV7 с флуоресцентными метками ROX и BHQ2 в позиции 542-565 нуклеотида, позволяющего учитывать результаты реакции в режиме реального времени. Выбор праймеров и зонда обоснован рекомендациями Wacharapluesadee S. et al. [11]. Последовательности праймеров отличаются от таковых в геномах других штаммов вируса бешенства не менее чем на 7 нуклеотидов, количество переменных нуклеотидов в пределах последовательности зонда у других изолятов было не менее 3, последовательность 3'-конца зонда имеет значительные отличия от таковой у других штаммов вируса бешенства. Для повышения эффективности гидролиза зонда RV7 за счет 5'-экзонуклеазной активности фермента Taq-полимеразы к 5'-концу зонда добавлено три нуклеотида «ААТ», некоплементарных консенсусной последовательности G-L локуса вируса бешенства штамма «Москва 3253»:  
RV5-5'-GTTGGGCACTGAAACTGCTA-3';  
RV6-5'-GAATCTCCGGGTTC AAGAGT-3';  
RV7-5'-ROX-AATCCTCCTTGAACTCCATGCGACAGA-BHQ2.

Данные праймеры и зонд были синтезированы в ЗАО «Синтол» (г. Москва).

На следующем этапе исследований определяли оптимальные условия ПЦР-РВ с подобранными праймерами RV5, RV6 и зондом RV7 с использованием ДНК, выделенной из культуры рекомбинантного штамма *E. coli* KM229, содержащего плазмиду  $\rho RV_{\text{Moscow3253}}$  G-L со встроенным фрагментом консенсусной последовательности G-L области вируса бешенства штамма «Москва 3253». В результате этого были определены оптимальные концентрации реактивов и оптимальный температурный режим амплификации. Данные представлены в разделе «Материалы и методы».

Аналитическую чувствительность метода определяли с использованием панели 10-кратных разведений кДНК вируса бешенства штамма «Москва 3253», полученного из вирусосодержащей мозговой суспензии кролика.

Для оценки воспроизводимости результатов определения вируса бешенства штамма «Москва 3253» два независимых исследователя провели параллельный анализ образцов, использованных при определении специфичности реакции. На конечном этапе эксперимента были получены сходные данные для всех проб; коэффициент вариации между значениями в параллельном анализе составил не более 5%.

Для подтверждения специфичности разработанной ПЦР-РВ сконструировали ПЦР-стандарты, которые были определены в ходе проведения количественной

ПЦР-РВ на матрице последовательных десятикратных разведений полученной рекомбинантной плазмиды  $\rho RV_{\text{Moscow3253}}\text{G-L}$ . С этой целью рассчитали концентрацию очищенного препарата плазмиды ( $\rho RV_{\text{Moscow3253}}\text{G-L}$ ): ее значение составило 1,4 мкг/мл, что соответствует  $2,9 \times 10^{11}$  ГЭ/мл.

Расчет количества геном-эквивалентов плазмиды  $\rho RV_{\text{Moscow3253}}\text{G-L}$  в полученном растворе проводили, используя формулу:

$$K \rho RV_{\text{Moscow3253}}\text{G-L} = A \times 0,234 \times 10^{12} [\text{ГЭ/мл}],$$

где  $A$  — концентрация плазмидной ДНК  $\rho RV_{\text{Moscow3253}}\text{G-L}$  в мкг/мл.

В реакцию брали 10 мкл плазмиды.

Для проведения количественной ПЦР принято использовать три ПЦР-стандарта, содержащих концентрацию ДНК в пределах, которые могут быть обнаружены в биологическом или ином виде материалов. В нашем случае в качестве объекта исследования предполагалось использование органо-тканевого рабического антигена. В ходе ряда экспериментов было установлено, что при исследовании препаратов кДНК вируса бешенства штамма «Москва 3253», полученных из мозговой суспензии кролика, оптимальным для осуществления количественной ПЦР является применение разведений  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,

$10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  рекомбинантной плазмиды  $\rho RV_{\text{Moscow3253}}\text{G-L}$  (рис. 1). Данные разведения далее были обозначены нами как ПЦР-стандарты, обеспечивающие эффективность количественной ПЦР от 91 до 97%. Показатель коэффициента корреляции (R2) составил от 0,98000 до 0,99900.

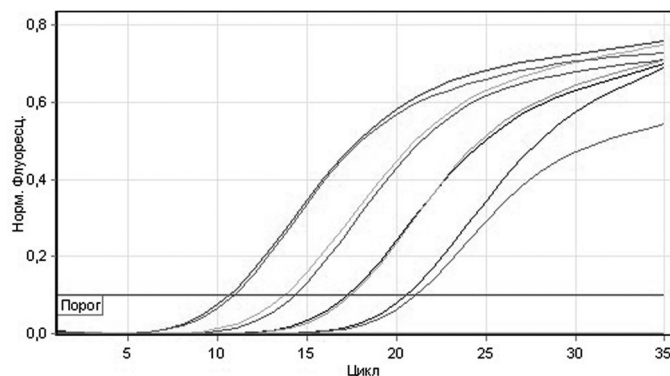


Рис. 1. Количественная ПЦР-РВ на матрице разведений  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  рекомбинантной плазмиды  $\rho RV_{\text{Moscow3253}}\text{G-L}$

Для дальнейших исследований были выбраны именно эти разведения плазмидной ДНК. Характеристика количественной ПЦР-РВ на матрице разведений  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  рекомбинантной плазмиды  $\rho RV_{\text{Moscow3253}}\text{G-L}$ , обозначенных нами как RV1, RV2, RV3, RV4, соответственно, указана в таблице 1.

Таблица 1

**Протокол количественной ПЦР-РВ на матрице разведений  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  рекомбинантной плазмиды  $\rho RV_{\text{Moscow3253}}\text{G-L}$**

№	Имя	Тип	СТ	Концентрация стандарта *	Концентрация расчетная	Коэффициент вариации, %	Средняя СТ
1	$10^{-5}$	RV1	10,64	2,90E+08	2,73E+08	5,9	10,77
2	$10^{-6}$	RV2	13,73	2,90E+07	3,18E+07	9,5	14,01
3	$10^{-7}$	RV3	17,24	2,90E+05	2,78E+05	5,5	17,35
4	$10^{-8}$	RV4	20,53	2,90E+03	2,81E+03	3,0	20,79
6	$10^{-5}$	Проба 1	10,90		2,28E+08		
7	$10^{-6}$	Проба 2	14,29		2,15E+07		
8	$10^{-7}$	Проба 3	17,46		2,39E+06		
9	$10^{-8}$	Проба 4	21,04		1,98E+05		
10	Интактный мозг	Отрицательный контроль					
11	ОКВ	Отрицательный контроль					
12	К-	Отрицательный контроль					

Примечание: \* единица измерения концентрации стандарта и концентрации расчетной — копий ГЭ/мл, коэффициенты +08, +07, +05 соответствуют  $10^8$ ,  $10^7$  и  $10^5$ , соответственно

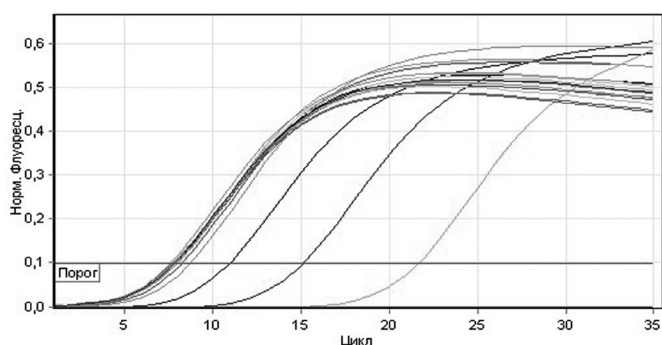


Рис. 2. Количественное определение вируса бешенства штамма «Москва 3253» в органо-тканевом антигене методом ПЦР-РВ

Для оценки специфичности разработанной ПЦР анализировали кДНК вируса бешенства штамма «Москва 3253» и проб кДНК интактного мозга кроликов.

Разработанная количественная ПЦР-РВ была апробирована на пробах кДНК вируса бешенства штамма «Москва 3253», полученных из инактивированной карболизированной 10% суспензии мозга кроликов, зараженных фиксированным вирусом бешенства штамма «Москва 3253». Учет результатов проводили при нали-

чии отрицательного результата в пробах К- и ОКВ по значению интенсивности флуоресценции сигнала путем сравнения исследуемого образца с ПЦР-стандартами RV1, RV2, RV3. Количественную оценку определяли с помощью программного обеспечения термоциклера RotorGene 6000.

Концентрации фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» в 12 исследуемых пробах мозговой суспензии кроликов представлены на рисунке 2.

Характеристика полученных результатов содержания фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» приведена в таблице 2. Количество вируса в исследуемых образцах составило:  $2 \times 10^9$  –  $2,81 \times 10^9$  копий/мл. Значение коэффициента корреляции соответствовало значению 0,99708, эффективность реакции – 0,89667.

Количественная ПЦР для определения содержания вируса бешенства штамма «Москва 3253» была многократно апробирована на исследуемых образцах органо-тканевого антигена. Концентрация вируса в исследуемых пробах составила:  $2,0 \times 10^8$  –  $8,81 \times 10^8$  копий/мл; коэффициент корреляции: 0,99708–1,00000; эффективность реакции: 0,89667–0,97000.

Таблица 2

**Протокол количественного содержания вируса бешенства штамма «Москва 3253» в органо-тканевом антигене**

№ проб	Имя	Тип	СТ	Концентрация стандарта*	Концентрация расчетная*	Коэффициент вариации, %
1	RV1	Стандарт	10,9	3,05E+08	3,51E+08	15,0
2	RV2	Стандарт	15,09	2,98E+07	2,41E+07	19,1
3	RV3	Стандарт	21,61	3,44E+05	3,70E+05	7,5
4	проба 1	Образец	7,65		2,81E+09	
5	проба 2	Образец	7,9		2,40E+09	
6	проба 3	Образец	7,72		2,68E+09	
7	проба 4	Образец	7,77		2,60E+09	
8	проба 5	Образец	8,18		2,00E+09	
9	проба 6	Образец	7,8		2,56E+09	
10	проба 7	Образец	7,77		2,60E+09	
11	проба 8	Образец	7,77		2,61E+09	
12	проба 9	Образец	7,74		2,65E+09	
13	проба 10	Образец	7,74		2,65E+09	
14	проба 11	Образец	7,88		2,42E+09	
15	проба 12	Образец	7,93		2,35E+09	
16	Интактный мозг	Отрицательный контроль				
17	ОКВ	Отрицательный контроль				
18	К-	Отрицательный контроль				

Примечание: \* единица измерения концентрации стандарта и концентрации расчетной – копий ГЭ/мл, коэффициенты E+09, +08, +07, +05 соответствуют  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$  и  $10^5$ , соответственно



### Заклучение

Таким образом, разработан способ количественной оценки содержания фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» в органо-тканевом антигене с использованием ПЦР-РВ. Данный метод может применяться как при производстве антирабического иммуноглобулина, так и в научно-исследовательских целях.

### Литература

1. *Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Лобовикова О.А. и др.* Производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина — итоги первых пяти лет // Пробл. особо опасных инф. — 2010. — № 3. — С. 58–62.
2. *Аронова Е.В., Калабеков И.М., Бурмакина Г.С. и др.* Разработка тест-системы на основе ПЦР в режиме реального времени для идентификации генома вируса болезни Ибараки // Биотехнология. — 2012. — № 6. — С. 70–75.
3. *Забияка Ю.И., Файзулов Е.Б., Борисова Т.К. и др.* Экспресс-метод оценки титра вируса краснухи в вирус-содержащей жидкости с помощью ПЦР-РВ // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2010. — № 5. — С. 57–62.
4. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Ж.* Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 479 с.
5. *Медуницын Н.В.* Медицинские иммунобиологические препараты, применяемые для специфической профилактики бешенства // Бюлл. «Вакцинация»: Бешенство. — 2005. — № 1(37).
6. *Морозова О.В., Гришечкин А.Е., Бахвалова В.Н. и др.* Динамика репродукции вируса клещевого энцефалита в культурах клеток // Вопросы вирусологии. — 2012. — № 2. — С. 40–43.
7. МУ 3.3.1.1099–2002 «Безопасность работы с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства. Методические указания». — М., 2002. — 28 с.
8. *Онищенко Г.Г.* О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2011 году. Государственный доклад. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. — 2012. — 316 с.
9. *Kosinova E., Psical I., Robesova B. et al.* Real-time PCR for quantitation of bovine viral diarrhoea virus RNA using SYBR Green I fluorimetry // *Veterinarian medicine*. — 2007. — Vol. 52(6). — P. 259–261.
10. *Radonic A., Thulke S., Hi-Gung Bae et al.* Reference gene selection for quantitative real-time PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Cameplox virus and Cytomegalovirus infections // *J. Virology*. — 2005, 2:7. doi:10.1186/1743-422X-2-7
11. *Wacharapluesadee S., Sutipauya J., Damrougwatanapokin S. et al.* Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus // *J. Virol. Methods*. — 2008. — Vol. 151. — No. 2. — P. 317–320.
12. WHO Expert Consultation on Rabies: first report. WHO technical report series 931. — Geneva, 2004. — 121 p.

## DEVELOPMENT OF A QUANTITATIVE EVALUATION OF THE CONTENT OF FIXED RABIES VIRUS STRAIN «MOSCOW 3253» IN RABIES ANTIGEN

Zh.V. MATVEEVA, E.G. ABRAMOVA, S.V. GENERALOV, N.V. MAYOROV

*Russian Research Institute of Plague «Microbe», Saratov*

A quantitative PCR with fluorescent hybridization-based on the results for the determination of fixed rabies virus strain «Moscow 3253» in organ-tissue antigens used for immunization producing rabies serum was developed. For quantitative PCR matched target DNA, primers and probe specific format TaqMan, PCR standards was selected. The conditions of amplification, the concentration of selected primers and PCR probe standards were optimized.

*Keywords:* real-time PCR, fixed rabies virus, rabies antigen.

## БИОПРЕПАРАТ «УНИВЕРСАЛ» И МИКРОВОДОРОСЛИ В УСЛОВИЯХ УГЛЕВОДОРОДНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Т.Н. ЩЕМЕЛИНИНА<sup>1\*</sup>, М.Ю. МАРКАРОВА<sup>1</sup>, Н.В. ЗЛОБИНА<sup>1</sup>, Ж.Л. ПАНТЮХИНА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГНУ «Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН»,

<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО «Сыктывкарский государственный университет», Институт естественных наук, Сыктывкар

Проведено исследование влияния биопрепарата «Универсал», микроводоросли *Chlorella vulgaris* и альго-бактериального консорциума на снижение содержания нефтепродуктов в модельной воде. Показана эффективность применения всех исследуемых биологических агентов в качестве нефтеструктуров. Установлено, что введение в нефтезагрязненную воду альго-бактериального консорциума приводит к снижению содержания нефтепродуктов на 23–28% за 7 суток. Разработанный альго-бактериальный консорциум на основе биопрепарата «Универсал» и микроводоросли *Chlorella vulgaris* может быть рекомендован в качестве наиболее перспективного биологического агента для повышения эффективности очистки нефтезагрязненных сточных вод и водных сред.

**Ключевые слова:** биопрепарат «Универсал», микроводоросли, альго-бактериальный консорциум, нефтезагрязненная вода, очистка.

### Введение

Углеводородное загрязнение в настоящее время занимает одно из первых мест по опасности воздействия на окружающую среду. Ежегодно в воду попадает почти 1,5 млн. кубических метров нефти и нефтепродуктов и около 45% утечек имеют естественные причины. Скорость самоочищения вод чрезвычайно мала, в связи с этим используют специальные технологии по обезвреживанию водной среды, среди которых одно из ведущих мест занимает биологическая очистка вод. Широкую популярность приобрели биопрепараты-нефтеструктуровы, состоящие из микроорганизмов, действие которых основано на окислении углеводородов. Кроме того, выявлена эффективность использования микроводорослей в биологической очистке. Предположительно, водоросли способны до некоторой степени разлагать различные нефти [17, 18], а также благодаря микроводорослям происходит насыщение водной среды молекулярным кислородом, который используется бак-

териями в качестве акцептора электронов для окисления органического вещества. Феномен стимуляции роста водорослей в присутствии алканотрофных бактерий и усиления деструкционной способности алканотрофных бактерий в присутствии водорослей открывает новые перспективы в использовании искусственных ассоциаций водорослей и алканотрофных бактерий в биочистке загрязненных экосистем. Поэтому в последнее время широко изучаются симбиотические отношения различных водорослей и микроорганизмов [14]. При комплексном взаимодействии биопрепарата и микроводорослей вероятно возможность наиболее действенного очищения среды от углеводородов.

В настоящей работе рассмотрена идея применения микроводорослей вида *Chlorella vulgaris* совместно с биопрепаратом «Универсал». Цель исследования заключается в оценке эффективности использования биопрепарата «Универсал» и микроводорослей *Chlorella vulgaris* для очистки нефтезагрязненных вод.

### Материалы и методы

В качестве объектов исследования были взяты биопрепарат «Универсал», штамм микроводоросли *Chlorella vulgaris* № 8 и модельная вода, загрязненная нефтью.

Для активизации биологического разрушения нефтепродуктов был использован биопрепарат «Универсал» (ООО «Бастет», г. Сыктывкар, автор Маркарова М.Ю.), состоящий из нефтеокисляющих

© 2014 г. Щемелинина Т.Н., Маркарова М.Ю., Злобина Н.В., Пантюхина Ж.Л.

\* Автор для переписки:

Щемелинина Татьяна Николаевна,

к.б.н., научный сотрудник,

Институт биологии Коми научного центра

Уральского отделения РАН.

167982 Республика Коми, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28

E-mail: shemelinina@ib.komisc.ru

микроорганизмов *Rhodotorula glutinis*, штамм 55-1-Р В-1115, *Rhodococcus equi*, штамм 34-1(28-99/2) В-1116, *Rhodococcus equi*, штамм У7-28 В-1117, *Rhodococcus equi*, штамм Р-72-00, выделенных из нефтезагрязненных почв Усинского района Республики Коми и способных к деструкции широкого спектра нефтяных углеводородов [3]. Продукт выпускается в лабораторных и производственных условиях путем культивирования методом глубинной ферментации с последующим высушиванием биомассы природных углеводородокисляющих бактерий. На препарат оформлен экологический сертификат соответствия № СЕР (1477)-Г-35/ОС-46 от 22.04.2011 [7]. Биопрепарат «Универсал» стимулирует разрушение углеводородов нефти, не участвует в процессах азотфиксации, нуждается в доступных элементах минерального питания (аммонийный и нитратный азот); после снижения концентрации углеводородов в почве, воде, донных отложениях численность вносимых с препаратом микроорганизмов падает до фоновых значений в связи с недостатком доступного углерода [7]. Перед началом работы проверили титр клеток в сухом биопрепарате «Универсал». Титр составил  $11 \times 10^9$  КОЕ.

Микроводоросль вида *Chlorella vulgaris* Beijer. var. *vulgaris* SykoA Ch-010-09 — одноклеточная зеленая водоросль с широким распространением как в водных, так и наземных условиях и в симбиозах с беспозвоночными (рис. 1). Индикатор альфа-мезосапробных условий, олиго-галобный-галофильный вид [1]. Распространение — космополитное. Благодаря простоте культивирования хлорелла является наиболее широко используемой в биотехнологических исследованиях микроводорослью. Штамм выделен и определен И.В. Новаковской и Е.Н. Патовой [5].

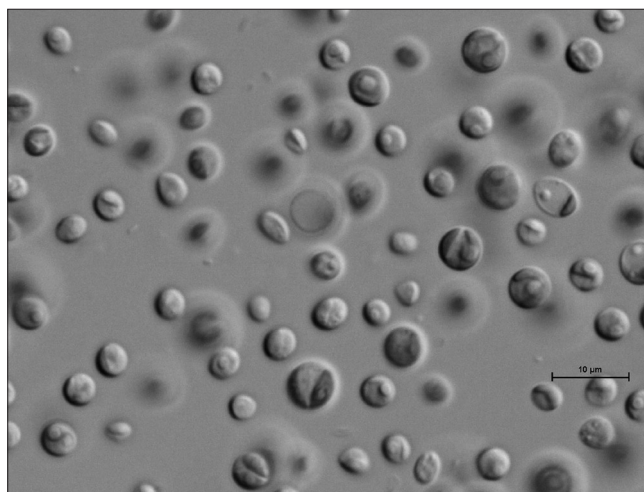


Рис. 1. Микроводоросль *Chlorella vulgaris*

Наработка биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris* проводилась на жидкой среде Тамия в течение 10 суток при комнатной температуре, в режиме освещения фитолампой OSRAM L 18W/77, в колбах на 250–100 мл биомассы при постоянной аэрации.

Штамм водоросли, культивированный на среде Тамия, был испытан в экспериментах с модельной водой в условиях круглосуточного освещения, постоянной аэрации, при комнатной температуре.

В эксперименте использовалась модельная вода с содержанием минеральных солей ( $\text{NaNO}_3$  — 1 г/100 мл воды,  $\text{KCl}$  — 0,1 г/100 мл воды,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,5 г/100 мл воды):

- № 1 (1 мл нефти на 100 мл воды);
- № 2 (5 мл нефти на 100 мл воды).

В качестве контроля была взята дистиллированная вода, загрязненная нефтью (см. схему опыта). Опыт проводился в трех повторностях.

Определяли массовую концентрацию нефтепродуктов в пробах методом колоночной хроматографии с гравиметрическим окончанием ПНД Ф 14.1:2.116-97 [4].

Учет численности клеток микроводорослей проводили на агаризованной среде Тамия [2]. Фотографировали и подсчитывали клетки под микроскопом MICROS (100-кратное увеличение).

## Результаты и обсуждение

### Альго-бактериальный консорциум

Применение активных штаммов микроорганизмов-деструкторов, выделение и использование устойчивых к загрязненным водам микроводорослей позволили создать новые комплексные биотехнологии очистки и восстановления экосистем водоемов и почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Эти технологии дают возможность проводить биоремедиацию водоемов и почв, подвергнутых систематическому аварийному загрязнению в течение многих лет нефтепродуктами и другими токсикантами. По сравнению с бактериальными системами, симбиотические ассоциаты водорослей и бактерий обладают большей эффективностью обработки [6, 10]. Более того, при сходных экологических условиях водоросли могут способствовать спонтанной флокуляции для улучшения качества обрабатываемых сточных вод. В то время как одни культуры водорослей могут оказывать прямое воздействие на разложение углеводородов [11], другие косвенно облегчают разложение, обеспечивая поверхность для адгезии нефтеокисляющих бактериальных культур

[8, 9, 12, 13, 15, 16]. В результате этого ассоциирования предотвращается вымывание бактериальных культур даже в турбулентных условиях [11]. Одной из задач эксперимента была проверка взаимодействия между клетками микроводоросли и клетками микроорганизмов, входящих в состав биопрепарата «Универсал».

В биомассу микроводорослей *Chlorella vulgaris* (титр клеток  $10^8$  КОЕ), наработанную на среде Тамия, вводили биопрепарат «Универсал» из расчета 1% от объема биомассы. Процесс образования альго-бактериального консорциума наблюдали под микроскопом в течение 2-месячного срока культивирования. Наблюдался прирост клеток микроорганизмов, входящих в состав биопрепарата, а также увеличение количества клеток микроводорослей и образование колоний, состоящих из обеих культур. На более поздних стадиях культивирования значительно увеличивалось как количество клеток микроводорослей и микроорганизмов, так и происходило разрастание колоний (рис. 2).

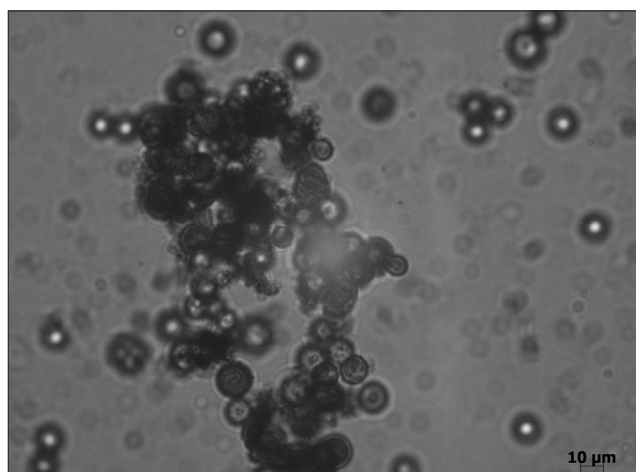


Рис. 2. Альго-бактериальный консорциум (на основе биопрепарата «Универсал» и микроводоросли *Chlorella vulgaris*). Фото на поздних стадиях культивирования

Из полученных результатов можно сделать вывод, что микроводоросль *Chlorella vulgaris* и микроорганизмы, входящие в состав биопрепарата «Универсал», не конкурируют, а, напротив, стимулируют рост друг друга, образуя альго-бактериальный консорциум.

#### Биологические агенты в очистке водной среды от нефтепродуктов

Следующим этапом работы было исследование влияния биологических агентов на изменение массовой концентрации нефтепродуктов в модельной воде. В экспериментальные колбы на 250 мл наливали дистиллированную воду по 100 мл, добавляли по схеме опыта (табл.

1) минеральные соли и стерилизовали. Вводили биопрепарат, микроводоросль и нефть. В качестве контрольного образца служила стерильная дистиллированная вода, загрязненная нефтью. Биопрепарат «Универсал» добавляли по 1 г на 100 мл воды, микроводоросль *Chlorella vulgaris* – по 1 мл на 100 мл воды. Нефть вносили по схеме опыта. Колбы ставили на качалку при 200–220 об./мин. на 7 суток при комнатной температуре. После этого содержимое колб оценивали по визуальным характеристикам и массовой концентрации нефтепродуктов [4].

Таблица 1

#### Схема опыта

Дистиллированная вода + нефть 1 мл/100 мл воды (Контроль)	Дистиллированная вода + нефть 5 мл/100 мл воды (Контроль)
Дистиллированная вода + минеральные соли + нефть 1 мл/100 мл воды	Дистиллированная вода + минеральные соли + нефть 5 мл/100 мл воды
Дистиллированная вода + минеральные соли + биопрепарат «Универсал» + нефть 1 мл/100 мл воды	Дистиллированная вода + минеральные соли + биопрепарат «Универсал» + нефть 5 мл/100 мл воды
Дистиллированная вода + минеральные соли + микроводоросль <i>Chlorella vulgaris</i> + нефть 1 мл/100 мл воды	Дистиллированная вода + минеральные соли + микроводоросль <i>Chlorella vulgaris</i> + нефть 5 мл/100 мл воды
Дистиллированная вода + минеральные соли + биопрепарат «Универсал» + микроводоросль <i>Chlorella vulgaris</i> + нефть 1 мл/100 мл воды	Дистиллированная вода + минеральные соли + биопрепарат «Универсал» + микроводоросль <i>Chlorella vulgaris</i> + нефть 5 мл/100 мл воды

В колбе с дистиллированной водой нефть оставалась на поверхности воды и частично происходило налипание нефти на стенки колбы (рис. 3). Аналогичную картину наблюдали в колбах с минеральной средой и в колбе с микроводорослями.

В колбе с биопрепаратом «Универсал» спустя семь суток нефть на стенках колбы отсутствовала, пленка на водной поверхности была разъедена, продукты распада нефти перешли в раствор, что говорило о высокой степени нефтеокисляющей активности испытуемого биопрепарата (см. рис. 3).

Нефтеокисляющая активность биопрепарата в присутствии микроводорослей была еще более высокая. За первые двое суток инкубации в присутствии альго-бактериального консорциума следы нефти исчезали и со стенок колб, и с поверхности среды, вся нефть переходила в растворенное состояние (см. рис. 3).



Рис. 3. Лабораторный эксперимент (нефть 5 мл/100 мл воды). 1 – дистиллированная вода + минеральные соли, 2 – дистиллированная вода + минеральные соли + биопрепарат «Универсал», 3 – дистиллированная вода + минеральные соли + микроводоросль *Chlorella vulgaris*, 4 – дистиллированная вода + минеральные соли + биопрепарат «Универсал» + микроводоросль *Chlorella vulgaris*

При исследовании изменения массовой концентрации нефтепродуктов опытных образцов было обнаружено, что очищение от нефтепродуктов по сравнению с контрольным вариантом происходило во всех колбах. При введении в колбы небольшого количества нефти – 1 мл / 100 мл воды – эффективность очистки была примерно одинакова во всех вариантах (табл. 2).

Таблица 2

### Массовая концентрация нефтепродуктов мг/дм<sup>3</sup>

	Нефть 1 мл/ 100 мл воды	Нефть 5 мл/ 100 мл воды
Дистиллированная вода	3700,0±400,0	31000,0±3000,0
Дистиллированная вода + минеральные соли	2800,0±300,0	31000,0±3000,0
Дистиллированная вода + минеральные соли + биопрепарат «Универсал»	2900,0±300,0	26000,0±3000,0
Дистиллированная вода + минеральные соли + штамм <i>Chlorella vulgaris</i>	2700,0±300,0	27000,0±3000,0
Дистиллированная вода + минеральные соли + биопрепарат «Универсал» + штамм <i>Chlorella vulgaris</i>	2600,0±300,0	23700,0±2400,0

При высоком загрязнении (5 мл / 100 мл воды) эффективность очистки зависит от введенных биоагентов. Снижение нефтепродуктов в воде только с минеральными солями за 7 суток происходит незначительно. Наиболее эффективным вариантом по снижению массовой концентрации нефтепродуктов является вариант с добавлением альго-бактериального консорциума (см. табл. 2).

### Заключение

На основании проведенной работы было выявлено, что клетки микроорганизмов (*Rhodotorula glutinis*, штамм 55-1-Р В-1115, *Rhodococcus equi*, штамм 34-1(28-99/2) В-1116, *Rhodococcus equi*, штамм У7-28 В-1117, *Rhodococcus equi*, штамм Р-72-00), входящие в состав биопрепарата «Универсал», не конкурируют с микроводорослью *Chlorella vulgaris*, а, напротив, вступают с ней в симбиотические отношения, образуя альго-бактериальный консорциум.

Установлено, что все используемые в эксперименте биологические агенты (биопрепарат, микроводоросль и полученный альго-бактериальный консорциум) снижают содержание нефтепродуктов в модельной воде. При среднем загрязнении нефтью (1 мл нефти / 100 мл воды) после внесения реагентов и минеральных солей эффективность очистки воды составила 19–28% от контроля за 7 суток. Для деструкции углеводородов в воде при среднем загрязнении достаточно внесение минеральных солей. При сильном загрязнении (5 мл нефти / 100 мл воды) степень очистки после внесения биопрепарата, водоросли и альго-бактериального консорциума составила 17, 14 и 23% от контроля за 7 суток, соответственно. Внесение же только минеральных солей снижало содержание нефтепродуктов в воде на 1,9%. Таким образом, наиболее эффективно в очистке загрязненной воды (при средней и сильной нефтяной нагрузке) проявил себя альго-бактериальный консорциум.

Разработанный альго-бактериальный консорциум на основе биопрепарата «Универсал» и микроводоросли *Chlorella vulgaris* может быть рекомендован для биологического этапа очистки нефтезагрязненных сточных вод промышленных предприятий и при нефтеразливах в водных средах.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований УрО РАН. Интеграционный проект № 12-И-4-2007 «Биоресурсный потенциал и биохимическая оценка микроводорослей Европейского Северо-Востока России в качестве объектов биотехнологии».

## Литература

1. Барина С.С., Медведева Л.А., Анисимова О.В. Биоразнообразие водорослей-индикаторов окружающей среды. — Тель-Авив: PiliesStudio, 2006. — 498 с.
2. Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И., Кабиров Р.Р. Современные методы выделения и культивирования водорослей: учебное пособие. — Уфа, 2008. — 152 с.
3. Маркарова М.Ю. Опыт применения биопрепарата «Универсал» для рекультивации нефтезагрязненных земель / Материалы 3-й научно-практической конференции «Экологические работы на месторождениях Тимано-Печорской нефтегазоносной провинции. Состояние и перспективы», Ухта, 2004. — С. 229–233.
4. Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах природных и очищенных сточных вод методом колоночной хроматографии с гравиметрическим окончанием. ПНД Ф 14.1:2.116-97.
5. Новаковская И.В., Патова Е.Н. Коллекция живых штаммов микроводорослей Института биологии Коми НЦ УрО РАН и перспективы ее использования // Изв. Коми научного центра УрО РАН. — 2012. — № 2(10). — С. 36–41.
6. Шарипова И.Э., Маркарова М.Ю., Гарабаджиу А.В. Комплексный биосорбент на основе штаммов бактерий и грибов для очистки водных сред от нефти в присутствии микроводорослей // Патент РФ № 2422587/03, С1 Е02В 15/04, С02F 3/32, С02F 3/34, С12N 1/26, 2011.
7. Экологический сертификат соответствия № 00001477. Дата выдачи 22 апреля 2011.
8. Al-Awadhi H., Al-Hasan R.H., Sorkhoh N.A. Establishing oil-degrading biofilms on gravel particles and glass plates // International Biodeterioration & Biodegradation. — 2003. — Vol. 51. — P. 181–185.
9. Al-Hasan R.H., Sorkhoh N.A., Al-Bader D. Utilization of hydrocarbons by cyanobacteria from microbial mats on oily coasts of the gulf // Applied Microbiology & Biotechnology. — 1994. — Vol. 41. — P. 615–619.
10. Borde X., Guieysse B., Delgado O. Synergistic relationship in algal-bacterial microcosms for the treatment of aromatic pollutants // Bioresource Technology. — 2003. — Vol. 86. — P. 293–300.
11. Chavan A., Mukherji S. Effect of co-contaminant phenol on performance of a laboratory-scale RBC with algal-bacterial biofilm treating petroleum hydrocarbon-rich wastewater // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. — 2010. — Vol. 85. — P. 851–859.
12. Cunningham C., Rauchenwald H.V. Algae production in wastewater treatment: prospects for Ballen / LoCal-RE Summer Research Program, 2010. — 37 p.
13. El-Bestawy E.A., El-Salam A.Z.A., Mansy A.E.H. Potential use of environmental cyanobacterial species in bioremediation of lindane-contaminated effluents // International Biodeterioration & Biodegradation. — 2007. — Vol. 59. — P. 180–192.
14. Park Y., Je K.W., Lee K. Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by co-inoculation with *Brevundimonas* sp. isolated from the microalga // Hydrobiologia. — 2008. — Vol. 598. — P. 219–228.
15. Radwan S.S., Al-Hasan R.H., Salamah S. Bioremediation of oily sea water by bacteria immobilized in biofilms coating macroalgae // International Biodeterioration & Biodegradation. — 2002. — Vol. 50. — P. 55–59.
16. Raghukumar C., Viparty V., David J.J. Degradation of crude oil by marine cyanobacteria // Applied Microbiology & Biotechnology. — 2001. — Vol. 57. — P. 433–436.
17. Semple K.T., Cain R.B., Schmidt S. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae // FEMS Microbiology Letters. — 1999. — Vol. 170. — P. 291–300.
18. Tang X., He L.Y., Tao X.Q. Construction of an artificial microalgal-bacterial consortium that efficiently degrades crude oil // Journal of Hazardous Materials. — 2010. — Vol. 181. — P. 1158–1162.

## EFFECT OF BIOPRODUCT «UNIVERSAL» AND MICROALGAE IN CONDITION OF HYDROCARBON CONTAMINATION

T.N. SCHEMELININA<sup>1</sup>, M.Y. MARKAROVA<sup>1</sup>, N.V. ZLOBINA<sup>1</sup>, J.L. PANTYUHINA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biology, Komi Scientific Center, Ural Branch RAS,

<sup>2</sup> Syktyvkar State University, Institute of Natural Sciences, Syktyvkar

The effect of a biological product «Universal», microalgae *Chlorella vulgaris* and alga-bacterial consortium to reduce the oil concentration in the water model was studied. The efficiency of all the studied biological agents as oil destructors was shown. It was found that the introduction of the oily water alga-bacterial consortium leads to lower oil content 23–28% for 7 days. Designed alga-bacterial consortium on the basis of a biological product «Universal» and microalgae *Chlorella vulgaris* can be recommended as the most promising biological agent to improve the cleaning efficiency of oil-contaminated waste water and aquatic environments.

**Keywords:** biological product «Universal», microalgae, alga-bacterial consortium of oil-contaminated water purification.

# ЗНАЧЕНИЕ МЕТОДА ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЙ ПОДВИЖНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ ОБОСНОВАНИЯ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА С ПРИМЕНЕНИЕМ АНТИСТРЕССОРНОЙ ТЕРАПИИ

Е.А. АНТИПЕНКО<sup>1\*</sup>, А.В. ДЕРЮГИНА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО «Нижегородской государственной медицинской академии» Минздрава России,

<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

Проведено исследование метода определения электрофоретической подвижности эритроцитов (ЭФПЭ) у 390 пациентов с разной степенью выраженности хронической ишемии головного мозга. Проанализирована динамика ЭФПЭ и клинические исходы при применении различных вариантов антистрессорной терапии. Продемонстрирована возможность использования ЭФПЭ для выбора варианта стресс-модулирующего воздействия у пациентов с хронической ишемией головного мозга.

**Ключевые слова:** электрофоретическая подвижность эритроцитов, хроническая ишемия мозга, антистрессорная терапия.

## Введение

Сосудистые заболевания головного мозга — одна из ведущих причин смертности и инвалидности в России и в мире [2, 11]. Хронические расстройства мозгового кровообращения остаются одной из важнейших проблем практической неврологии в связи с высокой распространенностью, неуклонно прогрессирующим течением заболевания, трудностями выбора адекватной терапии [4]. Эффективность лечебно-реабилитационных мероприятий у этой категории больных остается недостаточной. Это связано как с низкой приверженностью пациентов к лечению, так и с неадекватным подбором схем лечения, не учитывающих индивидуальные особенности компенсаторных возможностей больного [1, 3, 13]. В последние годы внимание исследователей привлекает взаимосвязь нарушений мозгового кровообращения с индивидуальным профилем стрессоустойчивости, поскольку активация внутренних саногенетических компенсаторных механизмов является одним из ключевых моментов терапии [10]. В связи с этим крайне важным представляется возможность анализа состояния стрессрегулирующей системы, что позволит индивидуализировать антистрессорную

терапию у пациентов с хронической ишемией головного мозга и, тем самым, повысить эффективность лечения.

Ранее нами было показано, что эффективным критерием выраженности реакций стресса и адаптации является электрофоретическая подвижность эритроцитов (ЭФПЭ) [5, 6, 9]. Анализ ЭФПЭ дает возможность выявить изменение функциональной активности надпочечниковой системы и диагностировать направленность процессов, связанных с активацией или угнетением неспецифической стрессустойчивости организма [7, 8].

Цель исследования — анализ динамики ЭФПЭ, как критерия оценки стрессустойчивости в ходе применения различных вариантов антистрессорной терапии у пациентов с хронической ишемией головного мозга.

## Материалы и методы

Обследовано 390 пациентов, страдающих дисциркуляторной энцефалопатией (ДЭ) первой (128 человек), второй (132 человека) и третьей (130 человек) стадии. Средний возраст пациентов составил  $47,7 \pm 5,6$  лет. Среди пациентов было 250 женщин и 140 мужчин. Диагноз формулировался в соответствии с общепринятыми клиническими критериями и подтверждался данными нейровизуализации. После стратификации в соответствии со стадией заболевания пациенты были распределены случайным образом на четыре группы. Первая группа получала базовую терапию (винпоцетин по 4 мл (20 мг) внутривенно капельно и пирацетам 5 мл (1000 мг) внутривенно струйно, ежедневно в течение 10 дней.

© 2014 г. Антипенко Е.А., Дерюгина А.В.

\* **Автор для переписки:**

Антипенко Елена Альбертовна

к.м.н., доцент кафедры неврологии, психиатрии и наркологии ФПКВ ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия»

E-mail: antipenkoea@gmail.com

Вторая группа на фоне базовой терапии получала комплексный антиоксидант (АО) цитофлавин по 10 мл внутривенно капельно на 200 мл 5% глюкозы, ежедневно в течение 10 дней. В качестве фармакологических моделей антистрессорной терапии дополнительно ежедневно в течение 10 дней применяли: 1) в третьей группе — стресс-лимитирующий (СЛ) препарат, содержащий дельта-сон-индуцирующий пептид (0,0003 г) и глицин (0,003 г), 2) в четвертой группе — комплексный адаптоген (Ад) растительного происхождения, содержащий экстракты жень-шеня и зеленого чая.

Исследовали ЭФПЭ при поступлении больных в стационар до начала терапевтических мероприятий (0 день) и после проведенного курса лечения (21 день). Группу контроля составили 50 здоровых добровольцев (средний возраст  $46,7 \pm 6,2$ ), среди которых было 37 женщин и 13 мужчин. Также оценивались неврологический статус и субъективные симптомы до и после лечения. Были проанализированы клинические исходы — отдаленные результаты лечения — через год наблюдения. Для оценки отдаленных результатов вмешательства применяли метод сопряженных таблиц с вычислением отношения шансов и относительного риска. Различия, полученные при сравнительном анализе, считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Измерение ЭФПЭ производили методом микроэлектрофореза [12]. В день определения ЭФПЭ готовили взвесь эритроцитов и использовали ее для измерения ЭФП отмытых эритроцитов. Отмытые эритроциты получали трехкратным центрифугированием при 1500 об./мин. в течение 10 мин. с 0,85% раствором хлористого натрия. Суспензию клеток разводили в 10 мМ трис HCl буфере (рН 7,4) и измеряли ЭФПЭ методом микроэлектрофореза в горизонтальной микрокамере при силе тока 12 мА.

Статистическая обработка материала проводилась в программе BIOSTAT с применением методов дисперсионного анализа. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом при ОКБ им. Н.А. Семашко.

## Результаты и обсуждение

Показатели ЭФПЭ при ДЭ достоверно отличались от показателей в группе здорового контроля при всех трех стадиях заболевания (табл. 1). При первой и второй стадиях ДЭ ЭФПЭ было повышено до лечения, что свидетельствовало об активации функции коры надпочечников. В третьей стадии обнаруживалось снижение ЭФПЭ по сравнению с группой контроля, что свидетельствовало о снижении функции коры надпочечников на этой стадии заболевания, отражающее истощение возможностей периферического звена регуляции стрессоустойчивости.

Таким образом, показатели ЭФПЭ на разных стадиях ДЭ отражали стадийность стресс-регулирующих реакций с активацией периферических приспособительных механизмов в первой и второй стадиях ДЭ и их истощением — в третьей стадии ДЭ. Снижение ЭФПЭ при различных экстремальных воздействиях и патологии является отражением общей неспецифичной реакции организма на раздражитель и критерием выраженности стресс-реакции [5, 7, 8]. Определявшиеся нами показатели адаптивной реакции крови непосредственно отражают изменение уровня глюкокортикоидов и катехоламинов, что позволило не исследовать их непосредственное содержание в плазме крови и моче.

Исследование изменения ЭФПЭ больных ДЭ после проведенной курсовой терапии показало, что она зависит от выбора препаратов лечения.

Таблица 1

### Электрофоретическая подвижность эритроцитов ( $\text{мкм} \cdot \text{см} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ) при разных стадиях ДЭ

Показатель	Группа контроля	ДЭ первой стадии	ДЭ второй стадии		ДЭ третьей стадии		$P_k$
			$P_{k, P1-2}$	$P_{k, P1-3}$	$P_{k, P2-3}$	$P_{k, P2-3}$	
ЭФПЭ, $\text{мкм} \cdot \text{см} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	$1,26 \pm 0,01$	$1,34 \pm 0,02 \uparrow$	0,05 0,6 0,03	$1,33 \pm 0,02 \uparrow$	0,05 0,03	$1,13 \pm 0,01 \downarrow$	0,03

Примечание: данные представлены в формате  $M \pm s$ , где  $M$  — среднее значение,  $s$  — среднее квадратичное отклонение.  $P_k$  — отличие от группы контроля,  $P1-2$  — различие между первой и второй стадиями ДЭ,  $P2-3$  — различие между второй и третьей стадиями ДЭ,  $P1-3$  — различия между первой и третьей стадиями ДЭ



В первой группе (получавшей только базовую терапию) ЭФПЭ снижалась на 21-й день наблюдения у пациентов с первой стадией ДЭ, приближаясь к нормальному уровню, при второй стадии отмечено нарастание исходно увеличенного показателя, что отражало избыточную активацию стресс-реализующих механизмов. У пациентов с третьей стадией ДЭ достоверных изменений ЭФПЭ не обнаружено (табл. 2).

При включении в терапевтический комплекс АО (вторая группа) показатели ЭФПЭ повышались при всех трех стадиях заболевания на 21-й день наблюдения.

Стресс-лимитирующий препарат (третья группа) оказывал модулирующее воздействие на ЭФПЭ, уменьшая исходно повышенные (при первой и второй стадиях ДЭ) и увеличивая исходно сниженные (при третьей стадии ДЭ) показатели ЭФПЭ.

При применении Ад отмечено повышение ЭФПЭ при всех стадиях ДЭ.

В ходе исследования была выявлена взаимосвязь динамики ЭФПЭ и клинических исходов у пациентов с хронической ишемией головного мозга.

Клинические исходы у пациентов, получавших базовую терапию, распределились следующим образом: 9% — улучшение, 30% — стабилизация состояния, 43% — прогрессивное ухудшение, 12% пациентов перенесли

преходящие нарушения мозгового кровообращения в течение года наблюдения, 6% — перенесли инсульт. Следует отметить, что отдаленные результаты были наиболее благоприятны при первой стадии ДЭ (улучшение и стабилизация состояния у 34 пациентов из 41 наблюдений) — только у пациентов данной группы регистрировалось восстановление ЭФПЭ. При второй и третьей стадиях прогрессивное ухудшение отмечалось почти в половине случаев.

Применение АО вызывало повышение ЭФПЭ на всех стадиях заболевания, что свидетельствовало об активации адренало-гипофизарно-надпочечниковой оси. Клинические исходы при включении в терапевтический комплекс антиоксиданта: улучшение отмечено у 14% пациентов, стабилизация состояния — у 39%, прогрессивное ухудшение — у 25%, проходящие нарушения мозгового кровообращения — у 15%, инсульты — у 7%. Важно подчеркнуть, что применение антиоксидантной терапии в составе комплексного лечения увеличивало вероятность улучшения и стабилизации состояния, но не предотвращало развития острых нарушений мозгового кровообращения. Так, при определении отношения шансов снижался риск прогрессивного ухудшения на 0,5 ( $p=0,04$ ), но повышался риск развития проходящих нарушений мозгового кровообращения до 1,5 ( $p=0,04$ ) и инсультов до 1,6 ( $p=0,04$ ).

Таблица 2

**Динамика показателей ЭФПЭ (мкм · см · В<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>) в группах сравнения**

Стадия ДЭ	0 день	21 день	$p^*$	$p^\circ$
Базовая терапия				
Первая стадия	1,34±0,01	1,25±0,02* ↓	0,02	—
Вторая стадия	1,33±0,02	2,27±0,02* ↑	0,04	—
Третья стадия	1,13±0,01	1,16±0,01 ↑	0,60	—
Базовая + АО				
Первая стадия	1,35±0,01	1,40±0,02*° ↑	0,01	0,02
Вторая стадия	1,33±0,02	2,46±0,02*° ↑	0,01	0,03
Третья стадия	1,12±0,01	1,56±0,01*° ↑	0,01	0,03
Базовая + СЛ				
Первая стадия	1,34±0,01	1,26±0,01* ↓	0,02	0,1
Вторая стадия	1,33±0,02	1,27±0,01*° ↓	0,02	0,02
Третья стадия	1,12±0,01	1,21±0,02*° ↑	0,02	0,01
Базовая + Ад				
Первая стадия	1,34±0,01	2,56±0,01*° ↑	0,02	0,03
Вторая стадия	1,33±0,02	2,27±0,01*° ↑	0,02	0,03
Третья стадия	1,12±0,01	2,05±0,02*° ↑	0,02	0,03

Примечание: \* — отличие от исходного уровня ( $p \leq 0,05$ ); ° — отличие от группы, получавшей только базовую терапию ( $p \leq 0,05$ ); ↑ — повышение показателя. Данные приведены в мкм · см · В<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>

Включение стресс-лимитирующего препарата в состав комплексного лечения оказывало корректирующее воздействие на течение стресс-регулирующих процессов, что проявилось в восстановлении ЭФПЭ до показателей нормы при всех стадиях заболевания. Клинические исходы при включении в терапевтический комплекс стресс-лимитирующего препарата представлены так: улучшение — в 14% наблюдений, стабилизация состояния — в 56% наблюдений, прогрессирующее ухудшение — в 18% случаев, переходящие нарушения мозгового кровообращения — в 12% случаев. Благоприятный исход в виде улучшения и стабилизации состояния преобладал при всех трех стадиях заболевания. Отношение шансов на благоприятный исход значительно повышалось при включении стресс-лимитирующего препарата в терапевтический комплекс и составило 3,1 ( $p=0,01$ ). Относительный риск прогрессирующего ухудшения снижался до 0,3 ( $p=0,03$ ), относительный риск развития переходящего нарушения мозгового кровообращения составил 1,08 ( $p=0,03$ ), ни один из пациентов в течение года наблюдения не перенес инсульт.

Отмеченное избыточное нарастание ЭФПЭ при применении Ад отражало переактивацию адаптационных процессов. Клинические исходы при применении Ад характеризовались: улучшение — в 20% случаев, стабилизация состояния — в 37%, прогрессирующее ухудшение — в 10% случаев, переходящие нарушения перенесли 20% пациентов, 13% — перенесли инсульт. Имелось значимое повышение шансов на благоприятный исход (улучшение или стабилизация состояния), отношение шансов по сравнению с первой группой оставило 2,69 ( $p<0,05$ ). Значительно уменьшился риск прогрессирующего ухудшения: относительный риск равнялся 0,16 ( $p<0,05$ ); однако возрос риск развития переходящих и стойких нарушений мозгового кровообращения, относительный риск составил 1,19 ( $p\geq 0,05$ ).

### Заключение

Таким образом, на основе анализа ЭФПЭ продемонстрирована возможность исследования адапционно-приспособительных процессов при применении различных вариантов стресс-модулирующей терапии. Найдено, что приближение показателя ЭФПЭ в ходе проводимой терапии к значениям нормы свидетельствует об эффективности проводимой терапии, что проявляется в стабилизации клинических исходов. При исходном повышении ЭФПЭ выше  $1,33\pm 0,02$  мкм · см · В<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup>

общепринятая нейропротективная терапия стимулирует компенсаторные возможности пациента, не приводя к их истощению. В этом случае также целесообразно включение в лечебный комплекс неспецифической антистрессорной терапии. При исходном понижении ЭФПЭ ниже  $1,21\pm 0,02$  мкм · см · В<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup>, говорящем об истощении адаптационных резервов и низкой стресс-устойчивости, целесообразно применение препаратов специфического стресс-лимитирующего действия в составе комплексной непрерывной нейропротективной терапии.

Анализ результатов свидетельствует о возможности применения ЭФПЭ как критерия исходного уровня стресс-устойчивости для выбора варианта антистрессорной терапии и контроля динамики адаптационных процессов при комплексном лечении пациентов с хронической цереброваскулярной недостаточностью.

### Литература

1. Вербицкая С.В., Парфенов В.А. Вторичная профилактика ишемического инсульта в амбулаторной практике // Материалы X Всерос. съезда неврологов с междунар. участием. — Нижний Новгород, 2012. — С. 35.
2. Гусев Е.И. Проблема инсульта в России // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2003. — № 9. — С. 3–5.
3. Кадьков А.С., Шахпаронова Н.В. Комплексное лечение хронических сосудистых заболеваний головного мозга (дисциркуляторных энцефалопатий) // Consilium Medicum. — 2011. — № 1. — С. 5–8.
4. Камчатнов П.Р. Хронические расстройства мозгового кровообращения — возможности метаболической терапии. — М.: Медицина, 2008. — 39 с.
5. Крылов В.Н., Густов А.В., Дерюгина А.В. Электрофоретическая подвижность эритроцитов и стресс // Физиология человека. — 1998. — Т. 24. — № 6. — С. 108–111.
6. Крылов В.Н., Дерюгина А.В. Изменение электрофоретической подвижности изолированных эритроцитов при действии стресс-факторов // Гематология и трансфузиология. — 2011. — № 5. — С. 18–21.
7. Крылов В.Н., Дерюгина А.В. Типовые изменения электрофоретической подвижности эритроцитов при стрессовых воздействиях // Бюлл. эксп. биол. и мед. — 2005. — Т. 139. — № 4. — С. 364–366.
8. Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Антипенко Е.А. Электрофоретическая подвижность эритроцитов как способ оценки функции коры надпочечников при стрессе и патологических состояниях организма // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. — 2013. — Т. 9. — № 2. — С. 39–42.

9. Крылов В.Н., Дерюгина А.В., Захарова О.А., Антипенко Е.А. Неспецифические адаптационные реакции крови при хронической ишемии головного мозга // Клиническая лабораторная диагностика. — 2010. — № 12. — С. 28–30.
10. Неврология: национальное руководство / Под ред. Е.И. Гусева, А.Н. Коновалова, В.И. Скворцовой и др. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 1040 с.
11. Суслина Э.А., Варакин Ю.А., Верещагин Н.В. Сосудистые заболевания головного мозга. Эпидемиология. Патогенетические механизмы. Профилактика. — 2-е изд., доп. и перераб. — М.: МЕДпресс-информ, 2009. — 325 с.
12. Харамоненко С.С., Ракитянская А.А. Электрофорез клеток крови в норме и при патологии. — Минск: Беларусь, 1974. — 144 с.
13. Чуканова Е.И. Дисциркуляторная энцефалопатия (клиника, диагностика, лечение): автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.00.13 — М., 2005. — 43 с.

## THE VALUE OF THE ELECTROPHORETIC MOBILITY OF ERYTHROCYTES TO JUSTIFY THE COMPLEX TREATMENT OF CHRONIC CEREBRAL ISCHEMIA USING ANTISTRESS THERAPY

Е.А. ANTIPENKO<sup>1</sup>, А.В. DERYUGINA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Nizhny Novgorod State Medical Academy, Russian Ministry of Health,*

<sup>2</sup> *N.I. Lobachevsky Nizhny Novgorod State University, Nizhny Novgorod*

The research method for the determination of the electrophoretic mobility of erythrocytes (EPME) in 390 patients with varying degrees of severity of chronic cerebral ischemia was carried out. The dynamics EPME and clinical outcomes when using different options antistress therapy was analyzed. The possibility of using EPME to select option stress-modulating effects in patients with chronic cerebral ischemia was demonstrated.

*Keywords:* electrophoretic mobility of erythrocytes, chronic cerebral ischemia, anti-stress therapy.

## МОЛОЧНОКИСЛЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ В ТЕХНОЛОГИИ ПРОДУКТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СЫРЬЯ МОРСКОГО ГЕНЕЗА

С.В. ЖУРАВЛЕВА\*, Т.М. БОЙЦОВА, Ж.Г. ПРОКОПЕЦ

*Дальневосточный федеральный университет, Владивосток*

В статье дан краткий анализ существующих технологий продуктов на основе рыбного сырья с использованием молочнокислых микроорганизмов. Представлены данные исследований применения микроорганизмов *Lactobacterium acidophilum* в технологии рыбных пастообразных продуктов.

**Ключевые слова:** молочнокислые микроорганизмы, рыбное сырье, *Lbm. acidophilum*, пасты рыбные, ферментирование.

**Введение.** О пользе молочнокислых продуктов известно еще из Ветхого Завета, где говорится, что Авраам обязан своим долголетием употреблению сквашенного молока. В 76 г. до н.э. римский историк Плиний рекомендовал использовать кисломолочные продукты при лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта. В конце XIX — начале XX веков рядом авторов было показано положительное влияние молочнокислых бактерий на состав микрофлоры кишечника. В частности, в работах И.И. Мечникова сделан акцент на антагонистических взаимоотношениях лактобактерий и гнилостных бактерий.

Развитие микробиологии резко расширило и усовершенствовало области применения этих микроорганизмов. На основе их использования возникли крупные отрасли народного хозяйства. Наиболее широко молочнокислые микроорганизмы применяются в молочной промышленности для производства широкого ассортимента кисломолочных продуктов; они играют важную роль в хлебопечении, особенно при приготовлении ржаного хлеба, в формировании качества сырокопченых и сыровяленых мясных изделий.

Консервирующее действие продуктов метаболизма молочнокислых микроорганизмов используют в квашении овощей (капуста, огурцы, помидоры, арбузы и др.) и фруктов. Велика их роль в биологическом консервировании кормов — силосовании, при приготовлении некоторых слабоалкогольных напитков (квас).

Выявлен целый ряд антибиотикоподобных веществ, продуцируемых молочнокислыми бактериями, которые с успехом используются в пищевой промышленности и медицине.

Среди молочнокислых бактерий выявлены индикаторные штаммы — «живые реактивы», которые находят применение при исследовании витаминов и аминокислот в практике пищевой и витаминной промышленности [6].

Важная роль при созревании рыбных пресервов и образовании ароматических веществ принадлежит микроорганизмам семейства *Lactobacteriaceae*, близким по своим свойствам гетероферментативным молочнокислым микроорганизмам *Str. citrovorus* и *Str. diacetylactis*. В результате их жизнедеятельности образуются органические кислоты (в основном молочная кислота) и происходит снижение рН, что препятствует развитию гнилостной микрофлоры. Эти кислоты в сочетании с эфирными маслами специй и продуктами ферментативных реакций формируют вкусовую «букет» созревших пресервов.

Внесение чистых культур *Str. citrovorus* и *Str. diacetylactis* в начальный период посола рыбы способствует ускорению процесса созревания пресервов [4].

В странах Юго-Восточной Азии широко распространены пищевые продукты из рыб пониженной товарной ценности: ферментированные соусы, пасты, размягченные куски рыбы. Отличительная особенность этих продуктов — их способность храниться в условиях тропического климата в течение длительного времени без охлаждения. Это объясняется наличием в продуктах молочной кислоты, накапливающейся в результате жизнедеятельности молочнокислых бактерий при добавлении к рыбе углеродосодержащего сырья растительного происхождения. Такие технологии получили развитие в Таиланде, где в сбразиваемый продукт

© 2014 г. Журавлева С.В., Бойцова Т.М., Прокопец Ж.Г.

\* Автор для переписки:

Журавлева Светлана Валерьевна

к.т.н., доцент, Дальневосточный федеральный университет,

кампус ДВФУ, корпус № 25

E-mail: zhursvet@mail.ru

молочнокислые бактерии попадают естественным путем, из внешней среды. Качество таких продуктов варьирует в широких пределах и зависит от рецептуры, условий приготовления продукта, включая санитарно-гигиенические условия [7].

В Японии разработаны технологии ферментированных комбинированных паст, паштетов, пудингов, кремов, сочетающих в себе объекты морского промысла с другими животными и растительными белками [1, 3, 8].

Белковым компонентом продуктов, приготовляемых по этим технологиям, является промытый или непромытый рыбный фарш, фарш из кальмаров, мелких ракообразных и некоторых других объектов морского промысла. Дополнительным источником животного белка могут служить молоко и молочные продукты, печень и мясо домашних животных и птицы, яйца и яичные продукты, а также источники растительного белка — семена сои, земляной орех, семена хлопчатника, подсолнечника и кунжута, пшеница [5].

Состав белковой добавки подбирают таким образом, чтобы отношение водорастворимого белка к общему белку было в пределах 5–50%. В небольших количествах в рецептуры продуктов, приготовляемых по данным технологиям, могут включать животные жиры, растительные масла (соевое, льняное, подсолнечное, хлопковое, оливковое, кукурузное, кокосовое и др.). Источником углеводов чаще всего служат рис, пшеничная и кукурузная мука, картофель, батат, рисовый, кукурузный и картофельный крахмал, декстрин, сахароза (тростниковый сахар), мед, сок и мякоть яблок, апельсин, земляники [5].

Вся технология сводится в основном к измельчению, перемешиванию, нагреванию и выдерживанию смеси при определенной температуре, которая зависит от вида используемых ферментов или культур микроорганизмов, свойств добавленных белковых субстратов и их гелеобразующих способностей.

Проблемой использования молочнокислых микроорганизмов в высокобелковом сырье (смеси белков животного и растительного происхождения) активно занимаются и в европейских странах, США, России, что подчеркивает актуальность задачи.

Цель настоящего исследования — изучение возможности использования рыбного сырья для получения ферментированных пастообразных продуктов.

**Материалы и методы.** Объектами исследования служили: измельченная мышечная ткань рыб: минтай (*Theragra chalcogramma*), навага дальневосточная (*Eleginus grasilis*), керчаковые рыбы — бычки

(*Myoxocephalus*), сельдь тихоокеанская дальневосточная (*Clupea pallasii*), камбала (*Pleuronectes*); модельные системы фаршевых смесей; стандартная лиофильно высушенная культура ацидофильной палочки (вязкая) по ТУ 9229-369-00419785-04.

В работе использовались следующие методы исследования. Массовую долю воды, липидов, азотистых веществ, перекисное и кислотное число жира, влагоудерживающую способность (ВУС) определяли по ГОСТ 7636-85; рН — на рН-метре НМ-26S «ТАО Electronics CJ. LTD»; органолептическую оценку готовых продуктов — по ГОСТ 31339-2006 с использованием профильного метода, метода балльной оценки и предпочтений.

Для достижения цели последовательно исследовали этапы технологического процесса приготовления пастообразных продуктов:

- приготовление фарша;
- режимы ферментирования;
- подбор рецептуры;
- параметры технологического процесса;
- сроки годности продукта.

Для проведения эксперимента из рыбного сырья готовили измельченную мышечную ткань (рыбный фарш). С целью механизации процесса фаршеприготовления предложено использовать сепаратор рыбный (неопресс) «Фарш» или метод дезинтеграции, что позволяет механизировать процесс получения фарша, использовать мелкую рыбу и рыбу нестандартных размеров (табл. 1) [2].

Таблица 1

**Выход рыбного фарша в зависимости от способа разделки, % от массы целой рыбы**

Вид рыбы	Способ разделки		
	ручная	неопресс	метод дезинтеграции
Минтай	46,0	24,5	17,3
Сельдь т/о	40,5	21,0	12,0
Керчаковые рыбы (бычки)	30,5	20,2	13,5
Навага	44,5	23,0	17,0

В измельченную мышечную ткань вводили глюкозу, фруктозу, мальтозу в количестве 1% к массе фарша и активную культуру *Lactobacterium acidophilum*, массовая доля которых составляла 5 и 10%. Процесс ферментирования проводили при температуре 38 °С.

**Результаты и обсуждение.** Органолептическая оценка модельных образцов показала, что к моменту достижения рН 5,5 консистенция становится однородной, соусоподобной, вкус приятным с легкой кислинкой, запах — свойственный кисломолочным продуктам. Дальнейшее нарастание кислотности приводит к ухудшению органолептических характеристик и при рН ниже 4,9 наблюдается значительное отделение влаги от массы фарша, масса уплотняется, приобретает кислый вкус и запах.

Это дало возможность заключить, что процесс ферментирования целесообразно продолжать в течение 4 часов и в качестве углеводной составляющей предпочтительно использовать глюкозу.

При рекомендованных условиях обработки количество молочнокислых микроорганизмов в модельных системах составляло не менее  $1 \times 10^9$  КОЕ/г к концу ферментирования.

В качестве вспомогательного сырья и материалов при разработке рецептур пастообразных продуктов использовали: масло сливочное, икру горбуши некондиционную, остатки от разделки на филе лососей или сельди соленой или холодного копчения, печень говяжью бланшированную, соль, перец черный молотый.

Составление рецептуры проводили, изучая влияние каждого компонента на консистенцию продукта и количественный состав молочнокислых микроорганизмов в нем.

На основании полученных данных была разработана технологическая схема производства рыбных паст с высоким содержанием живых клеток *Lbm. acidophilum*, которая положена в основу разработанных нормативных документов на готовую продукцию (рис. 1).

Готовые пасты представляют собой продукты однородной, мажущей консистенции, цвет, запах, вкус которых зависит от вида вносимых добавок.

При изучении количественного состава молочнокислых бактерий в готовом продукте было установлено, что фоновое значение достигает  $2,1 \times 10^9$  КОЕ/г, в процессе хранения этот показатель несколько снижается и к 5 сут. хранения при температуре  $8^\circ\text{C}$  составляет  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/г, а при  $12^\circ\text{C}$  —  $1,2 \times 10^9$  КОЕ/г. К концу резервного времени хранения при температуре  $8^\circ\text{C}$  количество молочнокислых бактерий снижается до  $1,3 \times 10^5$ , а при  $12^\circ\text{C}$  —  $3,7 \times 10^5$  КОЕ/г.

Хранение образцов при аггравированных температурах в течение 7 сут. не приводило к появлению признаков окислительной порчи (табл. 2).

Дегустационные испытания образцов исследуемых продуктов проводили по 5-балльной системе путем

одновременного представления кодированных образцов исследуемого продукта в конце предполагаемого срока годности и свежесвыработанной продукции.



Рис. 1. Технологическая схема производства рыбных паст

Органолептическая оценка готовых продуктов не выявила существенных изменений продукции в период хранения.

На основании совокупности полученных данных, свидетельствующих о положительной гигиенической оценке испытанной продукции, рекомендовано установить срок годности разработанных рыбных паст с сохранной пробиотической активностью при температуре  $5\text{--}8^\circ\text{C}$  не более 7 сут. при относительной влажности воздуха не выше 75%.

К концу срока годности при температурном режиме хранения  $8^\circ\text{C}$  количество молочнокислых микроорганизмов составляет  $1,1 \times 10^7$  КОЕ/г, что позволяет отнести полученный продукт к пробиотическим продуктам.

Таблица 2

**Значение кислотного и перекисного чисел в процессе хранения**

Продолжительность хранения, сут.	Перекисное число, % йода			Кислотное число мг, КОН/на 1 г жира		
	1	2	3	1	2	3
Фон	0,095	0,07	0,011	1,98	1,05	1,1
5	0,04	0,01	0,035	2,01	1,32	1,34
7	0,061	0,054	0,087	3,86	3,74	3,35
12	0,15	0,073	0,154	4,73	4,87	4,56

**Литература**

1. Антипова Л.В., Толыгина И.Н., Батищев В.В., Дворянинова О.П. Новые тенденции в технологии специальных продуктов питания на основе гидробионтов // Успехи современного естествознания. — 2002. — № 6. — С. 76–79.
2. Бойцова Т.М. Современные технологии пищевого рыбного фарша и пути повышения их эффективности. — Владивосток: Издво Дальневост. унта, 2002. — 156 с.
3. Воронова В.М. Снижение содержания жира в мясных продуктах / Сер. Мясная пром-ть: Экспресс информация. — АгроНИИТЭИММП, 1988. — Вып. 16. — С. 8.
4. Голова Ж.А., Дедюхина В.П. Микробиология рыбы и рыбных продуктов. — М.: Агропромиздат, 1986.
5. Патент Япония № 4759933 Метод производства белковых пищевых продуктов или белковых пищевых веществ в пастообразном состоянии и метод производства пищевых продуктов из них. У. Ясудзо. Оpubл. 26.07.1988.
6. Таутова Е.Н., Хамитова А.С., Звольская В.А. Исследование культур микроорганизмов, применяемых в производстве некоторой кисломолочной продукции. [http://www.rusnauka.com/4\\_SND\\_2011/Biologia/6\\_79404.doc.htm](http://www.rusnauka.com/4_SND_2011/Biologia/6_79404.doc.htm).
7. Adams M.R., Cooke R.D., Rattagool P. Fermented fish of South East Asia // Trop. Sci. — 1985. — Vol. 25. — No. 1. — P. 61–73.
8. Monzini A. Aliments precuits surgelés a base de pate de sardine // FAO Fish Rept. — 1985. — No. 331. — P. 62.

**LACTIC ACID BACTERIA IN FOOD TECHNOLOGY USING RAW MATERIALS OF MARINE ORIGIN**

S.V. ZHURAVLEVA, T.M. BOYTSOVA, J.G. PROKOPETS

*Far Eastern Federal University, Vladivostok*

A brief analysis of the existing technology products based on raw fish using lactic acid microorganisms was done. Data from studies using microorganisms *Lactobacterium acidophilum* technology in fish paste products were presented.

*Keywords:* lactic acid microorganisms, raw fish, *Lactobacterium acidophilum*, fish paste, fermenting.

## СЕЛЕКТИВНЫЕ СИСТЕМЫ С ИОНАМИ ВОЛЬФРАМА – W(VI) И ВАНАДИЯ – V(V) В КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

Л.Е. СЕРГЕЕВА\*, С.И. МИХАЛЬСКАЯ, Е.Н. ТИЩЕНКО

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев, Украина*

Выдвинута идея и предложена методика использования в клеточной селекции ионов вольфрамата и ванадата (ингибиторов нитратредуктазы) для отбора усваивающих нитраты устойчивых клеточных линий растений. Получены и длительный срок культивируются устойчивые клеточные линии табака и сои.

*Ключевые слова:* клеточная селекция, ванадаты, вольфраматы, клеточные линии, нитратредуктаза.

В настоящее время биотехнология начинает занимать приоритетное место в экспериментальной работе. Среди биотехнологических методов выделяется клеточная селекция, которая, с одной стороны, является наиболее адекватным способом исследования фундаментальных процессов клетки, а с другой — создает предпосылки для получения форм растений с новыми (даже уникальными) характеристиками. Действие предварительно выбранного селективного агента позволяет выделить из общего массива клеток дикого типа необходимый вариант.

При этом клеточная селекция как метод экологически безопасна, поскольку замкнутая система *in vitro* исключает отрицательное воздействие на окружающую среду. Однако, как любой научный метод, клеточная селекция требует постоянного совершенствования для удовлетворения возникающих потребностей и решения неожиданных вопросов.

Новым направлением клеточной селекции представляется использование в качестве селективного агента ионов тяжелых металлов (ИТМ), входящих в состав анионов. Известно, что ИТМ отличаются широким спектром токсического воздействия на живой организм. В то же время имеется ряд ионов, которые «поражают» конкретную мишень. Особенно это касается вольфраматов ( $WO_4^{2-}$ ) и ванадатов ( $VO_3^-$ ), коренным образом нарушающих азотный обмен.

Азотный обмен является одним из кардинальных путей любой биологической системы. У высших растений

усвоение азота начинается с поглощения нитратов, а далее осуществляется постепенное восстановление азота:  $N^{5+}$  (нитраты)  $\rightarrow N^{3+}$  (нитриты)  $\rightarrow N^+$  (гипонитриты)  $\rightarrow N^-$  (гидроксиламин)  $\rightarrow N^{3-}$  (аммиак). Аммиак вступает в реакции с кетокислотами и образует аминокислоты. Отключение каждого звена может привести к прерыванию общего цикла. При этом, чем ближе нарушения к началу цепи, тем масштабнее будут изменения и тяжелее их результаты. Очевидно, что наиболее значительные негативные последствия обусловлены вмешательством в реакцию восстановления нитратов.

Попадая в клетку растения, нитраты редуцируются ферментом нитратредуктазой (НР, К.Ф. 1.6.6.1), которая достаточно изучена [1]. Весь ферментный комплекс НР состоит из двух частей, последовательно участвующих в передаче электронов от НАД(Ф)Н к нитрату:

- диафоразной, катализирующей перенос электронов от НАД(Ф)Н к цитохрому с или иным акцепторам;
- терминальной (редуктазной), содержащей молибденовый кофактор (МоСо) и переносящей электроны к нитрату [1, 3].

Конфигурация молекулы НР определяет активность фермента, с одной стороны, и чувствительность к внешним воздействиям, с другой. При этом структурные компоненты комплекса реагируют по-разному. Среди токсикантов, репрессирующих НР, выделяют ионы вольфрама W(VI) — ( $WO_4^{2-}$ ), вольфраматы и ванадия V(V) — ( $VO_3^-$ ), ванадаты.

W(VI) выступает биологическим антагонистом молибдена Мо(VI) и замещает этот элемент в составе кофактора комплекса НР, инактивируя его. V(V) ингибирует активность НР без встраивания в молекулу фермента.

© 2014 г. Сергеева Л.Е., Михальская С.И., Тищенко Е.Н.

\* Автор для переписки:

Сергеева Лариса Евгеньевна  
к.б.н., ст.н.с.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины  
03022 Украина, Киев, ул. Васильковская, 31/17



Используя свойства вольфрамата и ванадата, а также особенности и возможности метода клеточной селекции, была предложена гипотеза о перспективности отбора клеточных линий растений с измененным характером редукции нитратов.

На основании выдвинутой гипотезы была создана экспериментальная селективная система *in vitro*, которая соответствовала ряду условий: содержала только нитраты как источник азота и субстрат для НР, содержала вольфраMAT или ванадат как ингибитор НР, не содержала молибдата для дополнительного угнетения активности НР.

Следует также отметить, что вольфраMAT или ванадат прибавлялись в концентрациях, летальных для клеточных культур дикого типа. Такие концентрации были установлены — минимальное количество токсикантов, полностью ингибирующее рост клеточных культур в течение стандартного пассажа; эффективность таких доз подтверждалась анализом ДНК [2]. Все остальные компоненты питательных сред соответствовали оригинальному составу.

На селективных средах, содержащих летальные концентрации вольфрамата или ванадата, были получены

первичные колонии, а впоследствии выделены устойчивые клеточные линии растений. В клеточной селекции показателем стабильного роста культуры является относительный прирост сырой (сухой) биомассы ( $\Delta m$ ).  $\Delta m = (m_k - m_n) / m_n$ , где  $m_n$  и  $m_k$  — биомасса каллуса в начале и конце стандартного пассажа, соответственно.

В таблице 1 приведены показатели относительного прироста сырой биомассы каллуса различных клеточных линий табака и сои, устойчивых к вольфраMATу и ванадату.

Видно, что варианты сохраняли рост, независимо от вида стрессового агента и даже в случае их аддитивного действия. Устойчивость клеточных линий сохранялась и в случае длительного субкультивирования в отсутствие действия стрессового фактора (в отдельном случае длительность такого выращивания продолжалась более двух лет).

Таким образом, было продемонстрировано, что использование вольфраMATов и ванадатов в клеточной селекции может быть перспективным для отбора и исследования новых устойчивых клеточных линий растений, которых невозможно получить иными способами.

Таблица 1

**Относительный прирост биомассы каллуса ( $\Delta m$ ) W-устойчивых и V-устойчивых клеточных линий сои и табака, культивированных на средах с токсичными анионами**

Культура / Среда	$\Delta m$		
	Среда+VO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Среда+WO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Среда+V+W
Соя; W-устойчивая линия	2,98±0,13	3,75±0,48	1,75±0,17
Соя; V-устойчивая линия	1,95±0,18	0,93±0,35	0,54±0,11
Табак; V-устойчивая линия	1,57±0,27	0,67±0,24	0,39±0,11

Примечание: среда + VO<sub>3</sub><sup>-</sup> и среда + WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> содержали летальные концентрации анионов; среда + V+W — LD<sub>50</sub>

## Литература

1. Львов Н.П. Молибден в ассимиляции азота у растений и микроорганизмов. — М.: Наука, 1989. — 86 с.
2. Михальская С.И., Сергеева Л.Е., Тищенко Е.Н. Цитогенетический анализ клеточной линии сои, устойчивой к оксианионам вольфрама // Физиология и биохимия культ. растений. — 2010. — Т. 24. — № 2. — С. 125–131.
3. Fisher K., Barbier G.G., Hecht H.-J. et al. Structural basis of eukaryotic nitrate reduction: crystal structures of the nitrate reductase active site // Plant Cell. — 2005. — Vol. 17. — No. 4. — P. 1167–1179.

## **SELECTIVE SYSTEMS WITH TUNGSTATE – W(VI) AND VANADIUM – V(V) IONS IN THE PLANT CELL SELECTION**

L.E. SERGEEVA, S.I. MYKHALSKA, E.N. TISHCHENKO

*Institute of Plant Physiology and Genetics NAS Ukraine, Kiev, Ukraine*

The idea and method of the cell selection with the utilization of the tungstate and vanadium ions (the nitrate reductase inhibitors) for obtaining resistant plant forms that reduced nitrates were created. Long cultivated cell lines of tobacco and soybean were obtained.

*Keywords:* cell selection, tungstate and vanadium ions, cell lines, nitrate reductase.

## БИОЭКОНОМИКА В РОССИИ: СЛЕДОВАНИЕ ШАБЛОНАМ ИЛИ РЕАЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КОМПЛЕКСНОГО РАЗВИТИЯ?

Т.Н. ГАЕВА\*, Р.Г. ВАСИЛОВ

*Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,  
Общероссийская общественная организация «Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова»,  
Москва*

Представлен обзор о перспективах развития в России биоэкономики как эффективного макроэкономического механизма, позволяющего качественно изменить экономику в целом на базе высоких ресурсосберегающих биотехнологий, сохранения экологии и социальной направленности.

*Ключевые слова:* биоэкономика, биотехнология, федеральный и региональный аспекты.

Термин «биоэкономика» появился в развитых западных странах недавно, на рубеже XX и XXI-го веков, на пике развития биотехнологии как области науки, имеющей широкий практический выход. Расшифровка генома человека, появление геномных и постгеномных технологий придали ей дополнительный мощный импульс. Символично, что, как следует из открытых источников, понятие «биоэкономика» (bio-based economy) впервые было озвучено в 1997 году на научном семинаре по геномике, организованном Американской Ассоциацией по развитию науки (American Association for the Advancement of Science) [7]. Его авторами считаются Хуан Энрикес и Родриго Мартинес [5, 6]. Опираясь на глубокое понимание цивилизационного значения проекта «Геном человека», они предсказали наступление новой эры не только в научных исследованиях, но и, как следствие открывающихся новых возможностей, — в экономике и социальной жизни [11, 15]. Фактически, отталкиваясь от сугубо научной области фундаментальных геномных исследований, им удалось уже в ближайшей перспективе увидеть их грандиозное трансформирующее влияние на экономику и общество в целом. Совсем немного времени понадобилось миру для того, чтобы убедиться в правильности этого предвидения.

В основе геномики лежит изучение на молекулярном уровне генов, способов их модификации, дизайн и создание новых генетических конструкций любого уровня сложности, что является эффективным инструментом направленного воздействия на свойства и функции живых систем. Многообещающие открытия в этой области оказались не только не замеченными крупными западными компаниями, но очень быстро были преобразованы в революционные биотехнологии, нашедшие широкое применение практически во всех экономических сегментах: в здравоохранении (новые вакцины и лекарства, высокотехнологичные методы диагностики и лечения, Р4-медицина, клеточные технологии, искусственные органы и др.), промышленности (микробиологической, химической, пищевой и перерабатывающей, производство новых материалов и биопластиков и др.), сельском, лесном и рыбном хозяйстве (сохранение генофонда, клонирование, улучшение пород животных и свойств растений, биологические удобрения, средства защиты и стимуляторы роста, органическое земледелие, новые препараты для ветеринарии, растения-«биореакторы», аква- и марикультура и др.), энергетике (ресурсосберегающие технологии для ЖКХ, автономная энергетика, «зеленое» топливо для транспорта, новые источники возобновляемой энергии, в том числе для медицины, космических исследований и др.), экологии (переработка отходов, сохранение биоразнообразия и биоценозов, биобезопасность, биологические способы очистки воды и почвы от ксенобиотиков, токсикантов, разливов нефтепродуктов, экологически чистое жилье и др.), геолого-минералогической отрасли (повышение нефтеотдачи пластов, эффективности извлечения золота и выщелачивания цветных металлов и

© 2014 г. Гаева Т.Н., Василлов Р.Г.

\* **Автор для переписки:**

Гаева Татьяна Николаевна

к.б.н., зам. начальника отделения биоэнергетики

НИЦ «Курчатовский институт»

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: Gaeva\_TN@nrcki.ru

др.). И это далеко не полный перечень возможностей биотехнологии для развития экономики, повышения качества жизни населения, сохранения среды обитания и рационального использования биоресурсов.

Лидером в сфере биотехнологии стали США. В стране, где хорошо развиты финансовые и потребительские рынки, частный бизнес работает на опережение и быстро улавливает еще не явные, но весьма перспективные тенденции. Растущий интерес к биотехнологиям повлек за собой приток капитала в эту сферу из других стран. Уже к концу 2000 года в США было зарегистрировано свыше 200 совместных биотехнологических компаний, в том числе 98 с японскими и 46 с западно-европейскими фирмами. В 2005 г. общее число биотехнологических компаний в США, по оценке Med ad News [9], достигло 500, причем проявилась тенденция к созданию интегрированных крупных консорциумов (в области биофармацевтики раньше, чем в других сегментах). Общий объем инвестиций в биотехнологические компании США составил около \$20 млрд. Из них 75% было получено за счет продажи акций биотехнологических компаний на бирже, 25% — составили вложения венчурных фондов и других частных инвесторов. Всего на IPO свои акции в 2005 г. разместили 30 биотехнологических компаний. Тенденция к дальнейшему росту сохраняется, несмотря на череду экономических и финансовых кризисов последнего периода. Начало 2014 года ознаменовалось бумом IPO среди биотехнологических компаний. Объем привлеченных финансовых средств в США в ходе размещения оказался выше, чем среднегодовая сумма IPO в секторе в 2008–2012 годах [8].

Не менее серьезное внимание развитию биотехнологии и биоэкономики уделяется и в странах Европейского содружества. По опубликованным данным, сектор биоэкономики в странах Евросоюза к настоящему времени достиг 2 трлн. евро; в нем занято 22 млн. человек, что составляет 9% общей трудозанятости населения [10].

Сегодня в числе стран, где очень сильны биотехнологические позиции, оказались не только такие экономически и технологически развитые государства, как Япония и Республика Корея, но и ключевые развивающиеся страны (Китай, Бразилия, Индия и др.), страны с переходной экономикой (Чехия, Польша, Венгрия и др.), а также новые индустриальные страны (так называемые «азиатские тигры» — Сингапур, Тайвань, Гонконг, Тайланд, Индонезия). Во всех этих странах осуществляются масштабные исследования, создается международная система новых знаний в области фун-

даментальной и прикладной биотехнологии, появляются объекты индустриального производства биотехнологических продуктов, обладающих востребованными качествами, с высоким уровнем конкурентоспособности и коммерциализации. Для интенсификации и большей координации деятельности в этой сфере многие государства, начиная с 2007 г., приступили к выработке национальных стратегий развития биотехнологии и официально анонсировали в качестве цели — построение биоэкономики (ЕС, США, Канада, Китай, Индонезия, Индия, Бразилия, Австралия и др.).

Следование задаче построения биоэкономики в том или ином государстве свидетельствует о высоком уровне социальной ответственности как основы общественного сознания [1]. Это вытекает из анализа моделей экономического развития. Так, в традиционной экономике правительство, общественные организации, бизнес по большей части проявляют заинтересованность в производстве продукции в объемах, достаточных для удовлетворения жизненных потребностей, получения прибыли, развития рынков и роста ВВП, не заботясь о том, какими способами осуществляется трансформация сырья в продукты и какое сырье для этого используется. Такую экономическую модель, основанную на экстенсивном извлечении и использовании невозобновляемых природных ресурсов, называют «сырьевой экономикой» или «петроэкономикой» (рис. 1). Она основана на принципе производства и потребления «здесь и сейчас» и доминирует в мире на протяжении столетий. Данная экономическая модель неизбежно ведет к истощению ископаемых ресурсов, загрязнению окружающей среды, ухудшению демографических показателей и выглядит крайне бесперспективно в современном развитом обществе, сориентированном на примат социального благополучия и высокого качества жизни.

Концепция биоэкономики меняет парадигму экономического развития, «закольцовывая» производственный процесс и потребление продуктов на эффект сохранности окружающей среды (как основы здоровья населения) и использование возобновляемых ресурсов (забота о будущих поколениях) (рис. 2). Для реализации новой экономической модели необходимо не только осознание на государственном уровне приоритетности данной стратегии, но и наличие прямого взаимодействия и каналов влияния со стороны общественных организаций и гражданского общества на действующие институты власти. Условием осуществимости модели биоэкономики является создание современной научно-технологической и производственной базы.

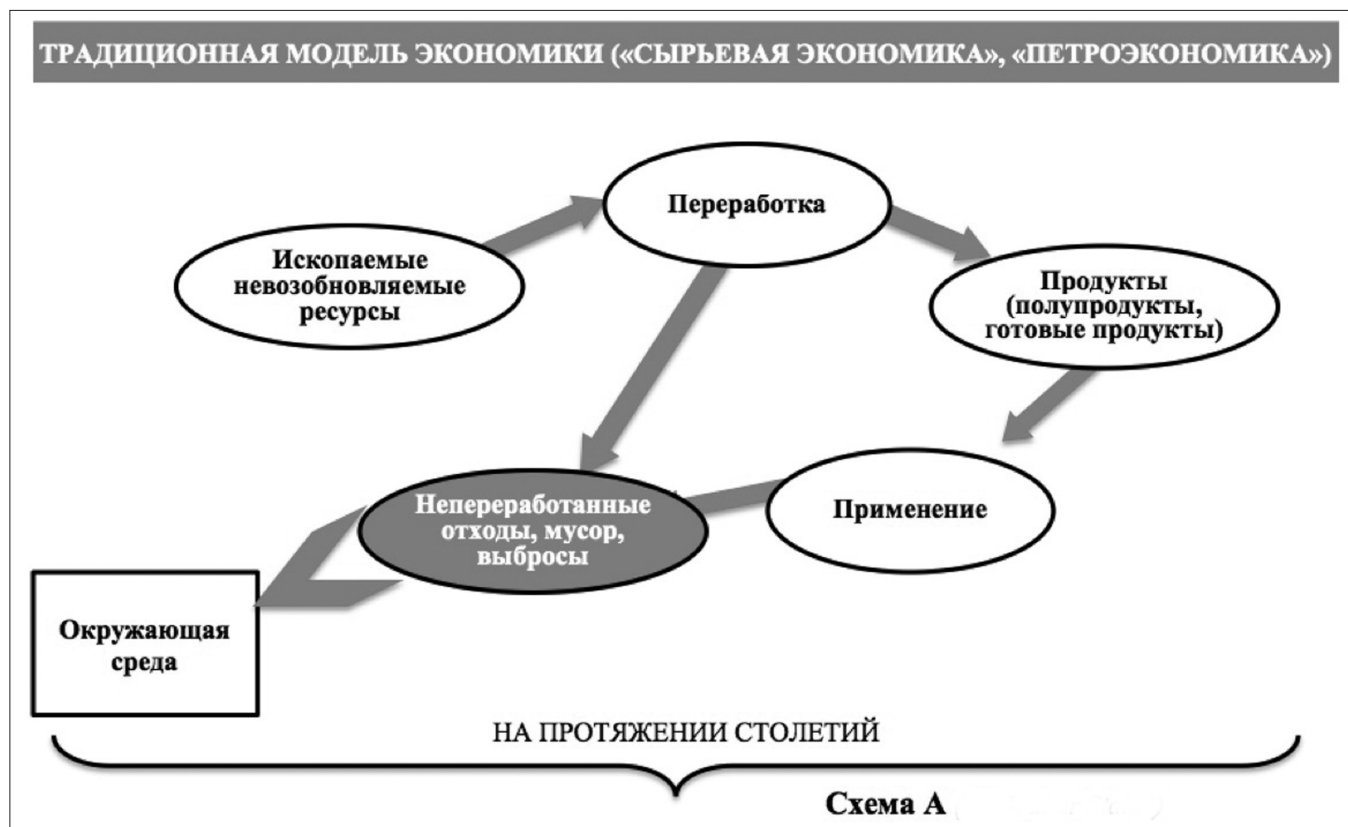


Рис. 1. Традиционная модель экономики, основанная на экстенсивном использовании невозобновляемых ископаемых ресурсов [13]

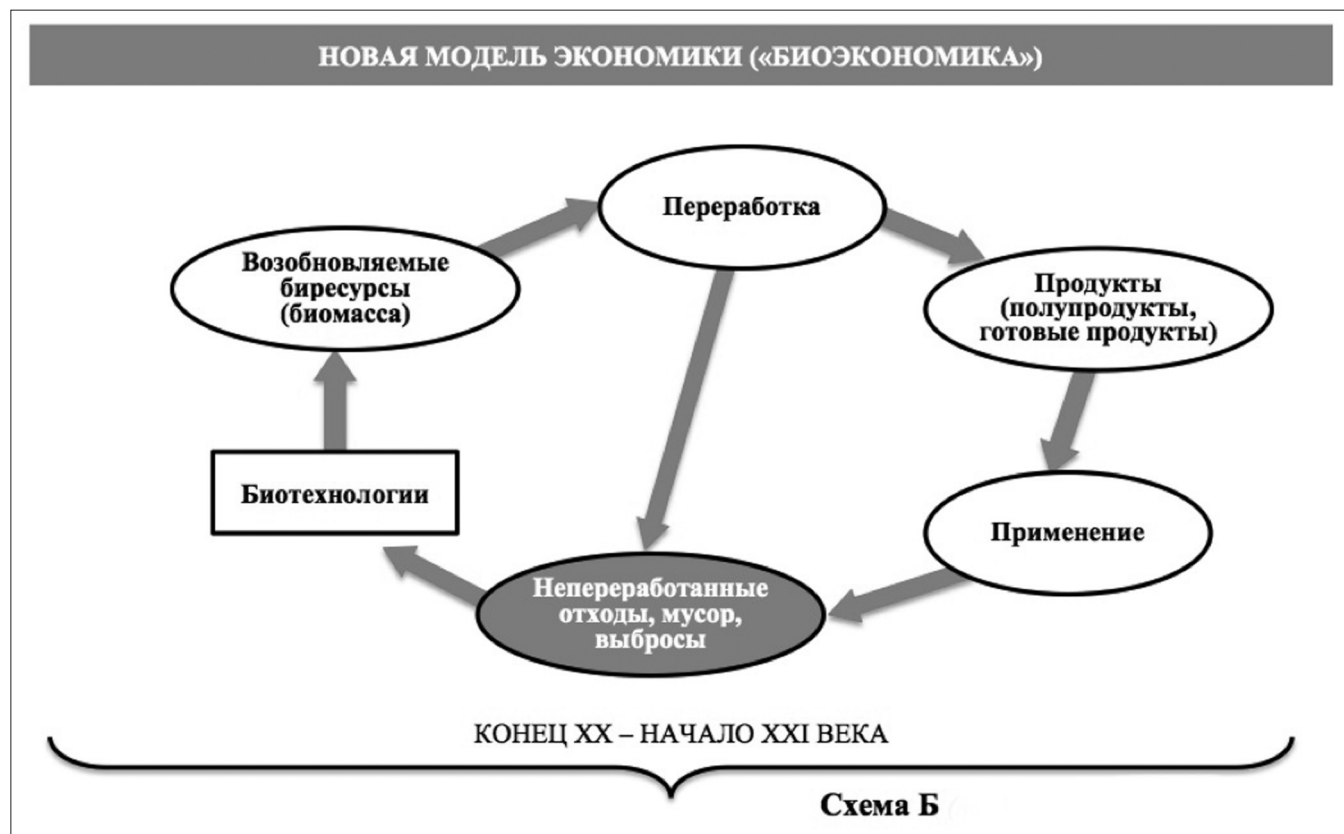


Рис. 2. Модель биоэкономики, основанная на использовании возобновляемых биоресурсов [13]

Так что же такое биоэкономика в словарных дефинициях? Как явление она еще не до конца понята и осмыслена, поскольку стержень ее роста — наука и технологии — находится в постоянном экспонентном развитии и сегодня уже, возможно, более уместно говорить не просто о биотехнологии как таковой, а о синергетическом комплексе конвергентных НБИКС-технологий (нано-, био-, инфо-, когно-, социо-), которые, в свою очередь, являются «приводными ремнями» развития VI технологического уклада [14]. На наш взгляд, наиболее точным на современном этапе выглядит следующее определение: биоэкономика — это новый тип экономики, основанной на использовании возобновляемых биоресурсов с применением биотехнологий и конвергентных наук с целью создания условий для гармоничного развития личности и обеспечения нового качества жизни населения, модернизации промышленности и построения постиндустриальной экономики без нанесения ущерба окружающей среде.

Таким образом, биоэкономика не выглядит каким-то искусственно возвращенным детищем благополучного западного мира. Она реально отвечает насущным потребностям цивилизационного развития любого государства, претендующего на то, чтобы именоваться технологически развитым и социально ответственным. Востребованность биоэкономики как экономики VI технологического уклада еще больше возрастает в связи с тем, что сегодня высокий потенциал научно-технологической сферы становится залогом государственной независимости и национальной безопасности.

Имея в виду перспективы развития биоэкономики в России, надо признать, что, на первый взгляд, выбор данной стратегии может выглядеть как желание не выпастать из мирового мэйнстрима, попытаться угнаться за «законодателями мод» в науке, технологиях, экономике. Однако в данном случае такая оценка вряд ли будет верной. Дело в том, что политика опережающего развития биотехнологии является для России, можно сказать, «хорошо забытым старым». Еще в 70–90-е годы XX века СССР был одним из признанных мировых лидеров в сфере биотехнологии (производство ферментов, аминокислот, БВК, ГФС, антибиотиков, биотоплива, биогаза и др.), обеспечивая около 5% мирового рынка с объемом \$3,2 млрд. Трудности постсоветского периода привели к резкому снижению научно-технологического уровня и к развалу биоиндустрии с текущим состоянием с крайне низкими показателями (Россия — не более 0,2% мирового объема; для сравнения: доля США — 42%, Евросоюза — 22%, Китая — 10%, Индии — 2%.) Как

результат, почти 80% основных видов биотехнологической продукции во всех экономических сегментах поступает в Россию по импорту [3, 12].

Сегодня Россия готова к тому, чтобы сконцентрировать усилия, создать новые точки роста в науке, промышленности, образовании и вернуться в группу стран-лидеров в сфере биотехнологии, но для это требуются определенные условия. Попробуем понять, можно ли рассчитывать на то, что они сложатся? Прежде всего, вселяет надежды тот факт, что в последние годы произошло осознание актуальности и значимости сферы биотехнологии и биоэкономики на всех уровнях социально-политического среза общества и государства. Свидетельством этого является утверждение Председателем Правительства Российской Федерации 24 апреля 2012 г. «Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года» (программа «БИО-2020») [2], в которой поставлена задача выхода России на лидирующие позиции в мире в области разработки биотехнологий и создания глобального конкурентного сектора биоэкономики.

Нельзя не отметить в этой связи большую работу, проделанную в течение 10 лет профессиональным биотехнологическим сообществом по подготовке этого по-настоящему исторического события. Десятилетний срок здесь определяется периодом деятельности Общероссийской общественной организации «Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова» (учреждено в 2003 году) и Некоммерческого партнерства «Союз предприятий биотехнологической отрасли» (учрежден в 2004 году). Помимо масштабной организационной и координационной работы по активизации деятельности биотехнологов, поддержки молодых ученых и молодежи, выстраиванию горизонтальных и вертикальных связей и взаимодействий, при участии экспертов этих двух общественных организаций в инициативном порядке были подготовлены следующие документы, внесшие практический вклад в разработку государственных программных документов по биотехнологии и заложившие теоретическую основу концепции развития биоэкономики в России:

- 2005 г. — Национальная программа «Развитие биотехнологии в Российской Федерации на 2006–2015 гг.» (на основе государственно-частно-общественного партнерства);
- 2010 г. — «Стратегия развития биотехнологии в Российской Федерации до 2020 г.»;
- 2010 г. — Целевая программа «Развитие биотехнологий в Республике Татарстан на 2010–2020 годы»;

- 2010 г. — Стратегия «Чувашия — биорегион» до 2020 года.

В настоящее время развитие научно-технологического потенциала в области биотехнологии и его масштабное практическое применение рассматривается Правительством Российской Федерации в качестве приоритетной стратегической задачи. И задачи вполне выполнимой. По сравнению с другими странами мира Россия обладает уникальным преимуществом для развития сегмента: огромными запасами биомассы — главного сырьевого ресурса биоэкономики. В большинстве зарубежных стран, несмотря на развитость научно-технологической сферы, недостаточность источников биомассы является серьезным лимитирующим фактором развития биоэкономики, для преодоления которого пока еще не найдено универсального решения. В России ситуация зеркально противоположная: на фоне имеющегося интеллектуального потенциала есть ощутимое отставание в технологической сфере, и именно это в значительной мере тормозит процесс развития биоэкономики.

Для отечественной биоресурсной базы характерно то, что несмотря на различие географических и природных условий, существующих на обширной территории Российской Федерации, практически все федеральные округа обладают значительными запасами тех или иных видов биомассы, а, следовательно, могут в полной мере использовать преимущества от ее переработки с применением биотехнологий. Однако стоит заметить, что пока лишь небольшое число российских регионов сделало выбор в пользу формирования на своих территориях «био-регионов» на основе широкого использования местных биоресурсов. В то же время концептуальной основой построения биоэкономики в России является инициирование широкой волны активности в направлении «снизу-вверх», то есть от уровня регионального к уровню федеральному. И это вполне логично: у каждого региона своя специфика как в отношении видов доступной биомассы, так и по комплексу решаемых задач экономического и социального характера. Причем, с нашей точки зрения, которая входит в противоречие с позицией некоторых экспертов, в России нет регионов, где развитие биотехнологий было бы преждевременным или нецелесообразным, а для территорий Сибири, Дальнего Востока, Крайнего Севера этот путь выглядит практически безальтернативным, имея в виду, в частности, решение проблемы «северного завоза». Представляется уместной аналогия, что на современном этапе развитие биотехнологии имеет большее значение для роста экономики, чем когда-то отводилось строительству дорог, которые образно называли

«кровеносной системой экономики». Бесспорно, состояние дорожно-транспортной сети в России по-прежнему не выдерживает никакой критики, строить их крайне необходимо, но, возможно, именно слаженная реализация профессионально подготовленных региональных программ развития биотехнологий послужит импульсом в том числе для решения этой хронической проблемы, причем в комплексе с широким спектром других вопросов экономического и социального характера.

Несомненным главным «плюсом», который обеспечивается широким внедрением биотехнологий, является развитие территорий, чему будут способствовать и расширение сегмента малой распределенной энергетики с использованием ресурса местной биомассы, и строительство объектов по глубокой переработке органического сырья («биорефайнинга») с соответствующим логистическим обеспечением, и интеграция инновационной инфраструктуры в виде технопарков, биоинкубаторов, центров масштабирования и др., и развитие сельского хозяйства на основе органического земледелия, рационального ресурсопользования, безотходного производства, и создание дополнительного потенциала рабочих мест на локальных рынках труда, и оживление предпринимательской деятельности с неизбежным увеличением налоговых поступлений в местные бюджеты и т.д.

Важно отметить следующую характерную особенность: развитие биоэкономики обеспечит особенно заметный социально-экономический эффект для наименее развитых регионов, традиционно занимающих в рейтингах самые низкие места.

Активная деятельность регионов по разработке собственных программ развития биотехнологии, при разумном управлении этим процессом, создаст общегосударственную архитектуру биоэкономики, основанную на региональной специализации. Это позволит избежать дублирования, распыления и нерационального расходования сил и ресурсов. Успех в развитии биотехнологий на региональном уровне, безусловно, во многом зависит от позиции местных органов власти, от их готовности поддержать это направление, но еще большее значение имеет инициативность профессионального сообщества, общественных организаций, представителей науки и бизнеса, их стремление преодолеть все препятствия и проявить настойчивость в достижении цели.

Поддержка биотехнологии и создание оптимальных условий для ее глубокого проникновения в экономику стали первоочередными вопросами в государственной повестке дня. 18 июля 2013 г. распоряжением Правительства Российской Федерации была утверждена Дорожная

карта развития биотехнологий и генной инженерии, в которой получили практическое развитие ключевые положения программы «БИО-2020». 4 февраля 2014 г. в Белгороде состоялось заседание Президиума Совета при Президенте России по модернизации экономики и инновационному развитию в области возобновляемых источников с посещением местных биоэнергетических объектов. Важнейшим итогом этого заседания стал вывод о необходимости принятия комплекса мер, направленных на поддержку существующих и создание новых научно-технологических центров масштабирования (пилотных центров) для разработки и последующей коммерциализации технологий с использованием возобновляемых источников, а также подготовки предложений по прикладным НИР и НИОКР в области промышленных биотехнологий, лесопромышленного комплекса, агробиотехнологий и биоэнергетики для финансирования в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы».

Одновременно нельзя упускать из вида такие направления деятельности по развитию производственной инфраструктуры и биотехнологического рынка, как совершенствование законодательной и нормативно-правовой базы биотехнологии, создание благоприятных условий для инвестиций в сферу биоэкономики.

Любая программа действий, каковой в конечном счете является и процесс широкого внедрения биотехнологий, предполагает гармоничное развитие всех элементов технологической цепочки: от фундаментальных и прикладных исследований до коммерциализации конкретных технологий и реализации биотехнологических проектов. Точкой уязвимости в доведении разработок до рынка, как правило, является недостаток финансовых ресурсов.

В последние годы, в свете современных тенденций сфера биотехнологии выглядит наиболее перспективной для инвестирования: в бизнесе набирает обороты такое направление, как социальное предпринимательство [3], а в глобальных инвестиционных стратегиях — новый вид инвестиций, так называемые «импакт-инвестиции» или «преобразующие инвестиции» (impact investing) [4]. Социальное предпринимательство реализуется в сфере решения социальных проблем, с которыми не удастся справиться государству. Преобразующие инвестиции направлены на стремительно формирующийся класс технологий, в основе которого лежит принцип совмещенной ценности (blended value) и специальные стандарты оценки предпринимательских проектов. Они оцениваются не только по обычным экономическим критериям, но и по

степени их влияния на решение социально значимых задач. Оба эти явления говорят о фактическом росте социальной ответственности бизнеса и общества. В Послании Федеральному Собранию в 2013 году Президент В.В. Путин поставил целый ряд задач, непосредственно относящихся к области импакт-инвестирования, в том числе:

- привлечение инвесторов в моногорода;
- формирование зон развития территорий Восточной Сибири и Дальнего Востока;
- формирование системы преференций для вновь создаваемых бизнесов.

Удивительно, насколько идеально все эти новые тенденции смыкаются в сфере реализации биотехнологических проектов. Объясняется это, как отмечалось выше, уникальными возможностями биотехнологии успешно решать широчайший круг социальных проблем (рис. 3).

В этой связи представляется особенно важным интенсифицировать работу по выполнению плана мероприятий программы «БИО-2020», которая содержит методологическую и концептуальную основу формирования биоэкономики в Российской Федерации, закладывает конкретные целевые ориентиры и показатели развития. К сожалению, сегодня, в 2014 году, оценивая выполнение программного плана мероприятий, можно увидеть просматривающуюся перспективу нереализуемости установленных индикаторов в намеченные сроки. Очевидно, нужны более взвешенные оценки имеющегося потенциала и определенные корректировки, а также усиление общей профессиональной и бизнес активности, углубленной работы по регулированию деятельности с использованием современных управленческих подходов.

К эффективным инструментам частно-государственного партнерства по поддержке и координации деятельности всех вовлеченных в сферу биотехнологий субъектов можно отнести профильные технологические платформы («Медицина будущего», «Биотех-2030», «Биоэнергетика» и др.), вошедшие в 2011 году в утвержденный Правительством РФ список. Их деятельность направлена на осуществление научных и деловых коммуникационных взаимодействий по созданию перспективных коммерческих технологий, новых продуктов, на привлечение ресурсов для проведения исследований и разработок по специально разработанной Стратегической программе исследований и Дорожным картам на основе участия всех заинтересованных сторон (государства, бизнеса, науки, гражданского общества), совершенствование нормативно-правовой и образовательной базы в области научно-технологического инновационного развития.





Рис 3. Социальный эффект преобразующих инвестиций в биотехнологии

В фокусе постоянного внимания технологических платформ находится также укрепление кооперационных связей и сотрудничества на межрегиональном, государственном и международном уровне, включая поддержку и содействие реализации проектов в рамках евразийской интеграции. Универсальным коммуникационно-информационным и развивающим ресурсом в этой сфере является проведение конференций, выставок, бизнес-миссий, партнеринговых мероприятий в формате «b2b» («бизнес для бизнеса»). Целесообразно распространять опыт проведения региональных мероприятий, посвященных задачам формирования биорегионов, таких как, например, форум «БиоКиров-2014», в работе которого принял участие Председатель Правительства РФ Д.А. Медведев. С большой степенью уверенности можно ожидать поддержки на государственном уровне решений, принятых участниками этого форума по проблемам развития биоэкономики в Кировской области, которые в своем большинстве характерны и для других российских регионов. Эффективной интеграционной площадкой, объединяющей российские биорегионы и перебрасывающей мостик к зарубежному биотехнологическому сообществу,

может стать проводимый на регулярной основе в Москве Международный партнеринговый конгресс и выставка по биотехнологии и биоэкономике «ЕвразияБИО».

Таким образом, можно признать, что в Российской Федерации происходит интенсивное и достаточно продуктивное формирование условий, необходимых для развития биоэкономики, начиная с регионального уровня. Как в любом сложном, многокомпонентном процессе, здесь также не обходится без определенных трудностей и неудач. Главное в этом случае — извлечение опыта, принятие адекватных мер, последовательное движение вперед. Успех дальнейшего прогресса зависит от объективных оценок, своевременных решений и слаженной деятельности в области науки, бизнеса, инвестиций и государственного регулирования.

### Литература

1. Василев Р.Г. Биоэкономика как следующий шаг развития — шанс для России // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2008. — Т. 4. — № 1. — С. 28–32.

2. Васильев Р.Г., Трубников В.И. О Комплексной программе развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года («БИО-2020») // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2012. — Т. 8. — № 3. — С. 46–52.
3. Почему они делают это? // Эксперт. Социальный бизнес. Специальный выпуск. — 2014. — № 26. — С. 4–7.
4. Чернышев С.Б. Не пропустить волну // Эксперт. — 2014. — № 15(894). — С. 36–39.
5. Enriquez-Cabot Juan, Martinez Rodrigo. Biotechnomy 1.0: A Rough Map of Biodata Flow // Harvard Business School Working Paper. — 2002. — No. 03-028.
6. Enriquez-Cabot Juan. Genomics and the World's Economy // Science Magazine. — 1998. — Vol. 281. — P. 925–926.
7. [http://en.wikipedia.org/wiki/Biobased\\_economy](http://en.wikipedia.org/wiki/Biobased_economy).
8. <http://horizon-magazine.eu/key-themes/bioeconomy>.
9. <http://rbcdaily.ru/world/562949990517658>.
10. <http://www.biorosinfo.ru>.
11. <http://www.medadnews-digital.com>.
12. [http://www.rsci.ru/grants/admin\\_news/340.php](http://www.rsci.ru/grants/admin_news/340.php).
13. Stahel W.R. [http://en.wikipedia.org/wiki/Walter\\_R.\\_Stahel](http://en.wikipedia.org/wiki/Walter_R._Stahel).
14. Tritto G., Panet M. New bioeconomics and NBIC // Genomics, Society and Policy. — 2008. — Vol. 4. — No. 3. — P. 26–45.
15. Vlavianos-Arvanitis A. The Bio-Environment – Bio-Culture – Bio-Peace for the Next Millennium / In: A. Vlavianos-Arvanitis (Ed.). Biopolitics – The Bio-Environment. Vol. V. — Athens: B.I.O., 1996. — P. 51–66.

## BIOECONOMY IN RUSSIA: THE TEMPLATES OR THE REAL POTENTIAL OF INTEGRATED DEVELOPMENT?

T.N. GAEVA, R.G. VASILOV

*National Research Centre «Kurchatov Institute»,  
Yu.A. Ovchinnikov Russian Biotechnology Society, Moscow*

An overview of future development in Russia bioeconomy as effective macroeconomic mechanism to perform a quality of the economy as a whole on the basis of high and resource-saving technologies, environmental conservation and social orientation was provided.

*Keywords:* bioeconomy, biotechnology, federal and regional aspects.

# ОПТИМИЗАЦИЯ ПУТЕЙ ТРАНСПОРТА ГЛЮКОЗЫ И СИНТЕЗА ЩАВЕЛЕВОУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ТРЕОНИНА

Д.М. БУБНОВ\*, Т.В. ЮЗБАШЕВ, И.Т. ГВИЛАВА, С.П. СИНЕОКИЙ

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ГосНИИгенетика), Москва

Организация процессов транспорта глюкозы и синтеза щавелевоуксусной кислоты в штаммах *Escherichia coli* более чем вдвое ограничивает максимальную теоретическую конверсию глюкозы в треонин и другие метаболиты, образуемые из фосфоенолпирувата. Существуют два принципиально различающихся подхода, позволяющих преодолеть это ограничение. Модификации может быть подвергнут механизм транспорта глюкозы через цитоплазматическую мембрану клетки. Замена основной транспортной системы глюкозы, фосфотрансферазной системы, на альтернативные фосфоенолпируват-независимые транспортеры приводит к увеличению продукции аминокислот аспартатного семейства, ароматических аминокислот и сукцината. С другой стороны, увеличение продукции этих метаболитов, за исключением ароматических аминокислот, а также аргинина и глутамата можно достигнуть без модификации нативной транспортной системы благодаря включению в метаболизм гетерологичного фермента пируваткарбоксилазы. В данном обзоре мы попытались разобрать отдельные случаи использования первого и второго подхода при конструировании штаммов биотехнологического назначения, а также сравнить обе стратегии с точки зрения их эффективности.

**Ключевые слова:** *Escherichia coli*, продуцент треонина, фосфотрансферазная система, ФЕП-независимый транспорт глюкозы, пируваткарбоксилаза.

## Введение

Современные успехи в биотехнологии во многом обязаны развитию методов генной и метаболической инженерии, позволяющих изменять существующие и создавать новые пути обмена веществ. Благодаря объему накопленных за последние десятилетия знаний одним из наиболее значимых объектов в этих исследованиях является *Escherichia coli*. Прогресс в использовании систем рекомбинации по коротким участкам гомологии [27], в области секвенирования, направленного мутагенеза, клонирования последовательностей ДНК в составе векторов, а также расширение знаний о метаболизме клетки сделали возможным создание высокоэффективных продуцентов важных метаболитов, в том числе и незаменимой аминокислоты L-треонина, используемой, главным образом, в качестве пищевой добавки.

При создании продуцента треонина модификациям подвергаются многие процессы метаболизма клетки. Традиционный подход включает в себя, в первую очередь, снятие эффекта ретроингибирования треонином с бифункционального фермента аспартаткиназы I-гомосериндегидрогеназы I путем введения точечных замен в ген *thrA* [12, 42, 67], кодирующий этот белок. Важным оказывается также уровень экспрессии всего оперона *thrABC*, контролирующего синтез треонина из аспартата [29, 44].

Положительный эффект на уровень продукции оказывают ослабление синтеза других аминокислот аспартатного семейства [5, 45, 58], инактивация транспорта треонина в клетку [39, 57, 70] и усиление его транспорта из клетки [7, 31, 41, 44].

В дополнение к этому используют инактивацию путей деградации треонина [2, 4, 15, 17, 28, 44, 50, 68, 77], увеличение соотношения НАДФН/НАДФ<sup>+</sup> [9, 14] и усиление ассимиляции аммония [3, 6, 11, 18].

В работах по минимализации генома *E. coli* было показано, что штаммы, имеющие несколько обширных хромосомных делеций, имеют более высокий уровень по продукции треонина [43, 53]. В области этих делеций картируются, как правило, гены, контролирующие де-

© 2014 г. Бубнов Д.М., Юзбашев Т.В., Гвилава И.Т., Синеокий С.П.

\*Автор для переписки:

Бубнов Дмитрий Михайлович

ГосНИИгенетика, Москва

E-mail: bubnov.dmitrii@mail.ru

градацию матричных РНК, транспозоны, гены малых РНК, профаги, а также гены, необходимые для роста только в специфических условиях [40, 52, 62].

Подходы к конструированию продуцентов треонина на основе культуры *E. coli* разнообразны и затрагивают многие процессы метаболизма клетки. Большинство вышеперечисленных модификаций направлено на усиление пути синтеза треонина, первой реакцией которого является образование аспартата в реакции аминирования кетогруппы в составе молекулы щавелевоуксусной кислоты (ЩУК). Таким образом, в штамме-продуценте интенсивность пути образования треонина многократно превышает таковую для природных штаммов. В этой ситуации процесс лимитируется потоком интермедиатов предшествующих этапов метаболизма в путь образования треонина. Ключевым соединением здесь выступает фосфоенолпируват (ФЕП), в реакции карбоксилирования которого образуется ЩУК. Вместе с тем известно, что в штаммах дикого типа *E. coli* с использованием ФЕП сопряжен процесс транспорта глюкозы через цитоплазматическую мембрану, субстраты с высоким содержанием которой используются в ходе промышленных процессов. Поэтому доступность ФЕП для реакции синтеза ЩУК и других процессов биосинтеза существенно ограничена (рис. 1А). В связи с этим в обзоре будут рассмотрены возможные пути модификации процессов транспорта глюкозы и синтеза ЩУК в штаммах, продуцирующих треонин и другие метаболиты на основе ФЕП, с целью повысить уровень их накопления и степень конверсии.

### Транспорт глюкозы и синтез ЩУК

Для *E. coli* известны несколько систем, обладающих способностью к переносу молекул D-глюкозы. Среди них основным и наиболее важным транспортером является фосфоенолпируватзависимая фосфотрансферазная система (ФТС). ФТС имеет наибольшую скорость транспорта и наименьшую  $K_m$  по отношению к глюкозе среди других транспортеров [36]. То есть, ФТС является наиболее эффективной системой транспорта. Уникальная особенность ФТС — фосфорилирование глюкозы в процессе переноса через мембрану с образованием глюкозо-6-фосфата, который может быть непосредственно вовлечен в реакции гликолиза. Таким образом, ФТС дублирует функцию глюкокиназы [63]. Данная особенность позволяет выделить ФТС в особое семейство транспортеров, где она является единственным представителем [66]. Стоит также отметить, что, кроме ФТС, переносицей и фосфорилирующей глюкозу, в

клетке *E. coli* и некоторых других факультативно анаэробных микроорганизмов существуют аналогичные системы, предпочтительным субстратом для которых являются сахароза, N-ацетилглюкозамин, манноза и другие углеводы.

ФТС представляет собой комплекс растворимых и мембранных белков. Растворимые компоненты являются общими для всех ФТС, при том, что мембранные субстратспецифичны. Гены глюкозной ФТС расположены в двух локусах. Оперон *ptsHICrr* контролирует синтез цитоплазматических белков (HPr, EI и EIIA, соответственно), а отдельный ген *ptsG* кодирует мембранный компонент (EIBC) [65].

Как можно заключить из названия, система функционирует как цепочка белков, переносящих фосфат от фосфоенолпирувата (с образованием пирувата) к мембранному компоненту. EIBC, в свою очередь, транспортирует молекулу глюкозы внутрь клетки и одновременно фосфорилирует ее, перенося фосфатную группу, полученную через EI, HPr и EIIA от фосфоенолпирувата. Таким образом, ФЕП служит донором фосфата и энергии для процесса транспорта глюкозы с последующим образованием глюкозо-6-фосфата. Как следствие, каждая вторая молекула ФЕП, полученная в результате реакций гликолиза, тратится на транспорт следующей молекулы глюкозы [63].

Метаболизм штаммов дикого типа *E. coli* организован так, что анаэробной реакцией синтеза ЩУК является карбоксилирование ФЕП, которое осуществляет ФЕП-карбоксилаза [26]. Показано, что на синтез ЩУК идет только 16,2% ФЕП, тогда как на транспорт глюкозы — 50% [72]. При этом *E. coli* не способна синтезировать ЩУК из пирувата, образующегося в результате активности ФТС. Причина заключается в отсутствии фермента пируваткарбоксилазы, осуществляющего такую реакцию. Принимая во внимание то, что ЩУК является непосредственным предшественником в пути синтеза треонина, модификация этого сегмента клеточного метаболизма наряду с другими представляется перспективной при конструировании штамма-продуцента треонина.

То есть, основная задача на пути к снятию ограничения уровня накопления треонина на уровне 50% от максимального значения — обеспечить эффективное сопряжение процессов транспорта и фосфорилирования глюкозы в клетку и синтеза ЩУК. Здесь можно выделить две основные возможности, одна из которых подразумевает под собой замену ФТС на ФЕП-независимые транспортеры (рис. 1Б), а другая — использование

ФТС как основного транспортера глюкозы в сочетании с гетерологичным ферментом — пируваткарбоксилазой, который осуществляет синтез ЦУК в реакции карбоксилирования пирувата (рис. 1В).

### Использование ФЕП-независимых транспортеров глюкозы совместно с фосфоенолпируваткарбоксилазой

ФТС как основной транспортер глюкозы может быть заменена или дополнена ФЕП-независимыми транспортерами, в числе которых наиболее перспективным является белок GalP, переносящий глюкозу и галактозу в симпорте с протоном. Неоднократно было показано, что штаммы с инактивированной ФТС, но обладающие повышенным уровнем экспрессии гена *galP*, способны утилизировать глюкозу [37].

Нужно отметить, что этот эффект наиболее ярко проявляется в случае совместного с GalP повышения активности глюкокиназы (Glc), фермента, осуществляющего реакцию фосфорилирования глюкозы с образованием глюкозо-6-фосфата (кодируется геном *glk*). Известно, что в присутствии глюкозы активность этого фермента в клетке понижена на 50%, поскольку его экспрессия подвержена влиянию катаболитной репрессии, опосредованной ФТС [49]. В штамме дикого типа этот фермент выполняет функцию фосфорилирования глюко-

зы, образовавшейся в клетке в результате расщепления олигосахаридов и полисахаридов [46].

Наиболее наглядно возможность использовать GalP и Glc как замену ФТС была продемонстрирована в работах по анализу мутаций в штаммах *E. coli* с дефектной ФТС, прошедших стадию селекции на минимальной среде с глюкозой. Через некоторое время в ходе культивирования в ферментере в проточном режиме были получены клоны, способные утилизировать глюкозу с той же скоростью, что и штамм дикого типа. Для них показан повышенный уровень экспрессии *galP* и *glk*, а также ряд других мутаций, позволивших расти в новых условиях [21, 34].

Для штаммов с дефектной ФТС, функция которой замещена транспортером GalP и глюкокиназой Glc, характерен более высокий уровень продукции соединений, для которых ФЕП является предшественником в пути синтеза. Делеция гена *galR* увеличивает продукцию треонина, поскольку этот ген кодирует репрессор гена *galP* [59]. Эффект показан на продуцентах ароматических аминокислот [22] и сукцината. Из недостатков GalP можно отметить на порядок более низкую удельную скорость транспорта, чем характерная для ФТС [36]. Поэтому полное замещение функции более эффективной системы требует экспрессии GalP и Glc под контролем сильных промоторов [37].

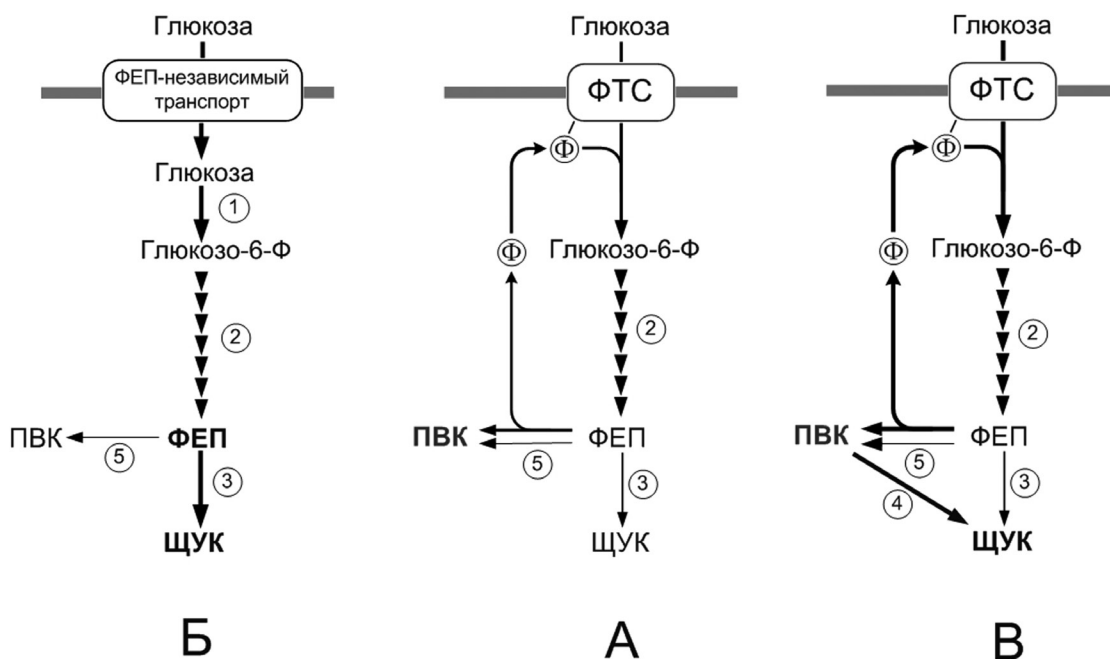


Рис. 1. Два альтернативных подхода к преодолению неэффективного сопряжения ФТС и ФЕП-карбоксилазы в штаммах дикого типа. (А) Штамм дикого типа. (Б) Замена ФТС на ФЕП-независимый транспорт. (В) Использование гетерологичной пируваткарбоксилазы. Обозначения: 1 — глюкокиназа, 2 — реакции гликолиза, 3 — ФЕП-карбоксилаза, 4 — пируваткарбоксилаза, 5 — пируваткиназа

Также для восстановления роста на глюкозе штамма с инактивированной ФТС могут быть использованы и другие транспортеры, в числе которых гомологичные по отношению к GalP белки XylE, AgaE и FucP. Известно, что, наряду со своими основными субстратами (D-ксилоза, D-арабиноза и L-фукоза, соответственно), они способны переносить в клетку глюкозу. Совместная с ФТС сверхэкспрессия XylE и FucP увеличивает продукцию L-фенилаланина на 20–30%, а L-треонина — на 20–40%, что связано с дополнительным потоком глюкозы в клетку, не связанным с дефосфорилированием ФЕП с образованием пировиноградной кислоты, которую *E. coli* не способна использовать для синтеза ЦУК [19]. Ввиду сходства структуры и механизма действия перечисленных транспортеров с GalP им свойственны те же недостатки. Даже под контролем сильных промоторов XylE, AgaE и FucP не обеспечивают достаточный поток глюкозы, необходимый для роста со скоростью, характерной для штамма с функционирующей ФТС [19].

В некоторых работах показано, что экспрессия гетерологичных белков Glf и Glk из *Zygomonas mobilis*, представляющих собой систему облегченной диффузии и глюкокиназу, соответственно, способствует росту штамма, имеющего неактивную ФТС, на среде с глюкозой в качестве источника углерода [64, 69, 76]. Кроме того, для такого штамма установлена повышенная продукция метаболитов шикиматного пути и соответственно аминокислот ароматического ряда. Интересно, что работа этой системы не сопряжена ни с падением протонного градиента на мембране, ни с затратами АТФ. То есть, транспорт пассивен и осуществляется по градиенту концентрации глюкозы. Как следствие, фермент обладает более высоким значением  $K_m$  (4,1 ммоль) [75]. Для сравнения:  $K_m$  (ФТС) составляет 3–10 мкмоль, а для GalP — 10,2 мкмоль [51]. Вследствие этого несмотря на более высокий уровень накопления аминокислот для штаммов, где функция ФТС замещена Glf и Glk, конверсия глюкозы в целевой продукт ниже, чем для изогенного штамма с активной ФТС.

В качестве ФЕП-независимого транспортера глюкозы, вероятно, может быть использован переносчик MglBAC. Эта система использует энергию АТФ, благодаря чему играет роль в поглощении сахаров против градиента концентрации и при низком содержании в среде. Возможность использования этой системы в качестве ФЕП-независимого транспортера глюкозы продемонстрирована в работе, где при культивировании штамма с дефектной ФТС на среде с глюкозой в результате спон-

танных мутаций были получены клоны с повышенным уровнем экспрессии MglBAC [34].

Таким образом, модификации пути транспорта глюкозы в клетку представляются перспективной мишенью при конструировании продуцента треонина на основе штаммов *E. coli*. Основным переносчиком глюкозы этого организма — ФТС, несмотря на свои преимущества, может быть заменен собственными или гетерологичными транспортерами. Это дает возможность не только эффективно осуществлять транспорт, но и сохранять 50% ФЕП, пул которого играет важную роль в процессах биосинтеза многих соединений. В их числе — треонин и другие аминокислоты аспартатного семейства, ароматические аминокислоты и сукцинат, общим в пути синтеза которых является ЦУК. На этом фоне при конструировании продуцента треонина кажется логичным усиление синтеза ЦУК.

Выше отмечено, что анаплеротическая реакция синтеза ЦУК в клетках *E. coli* катализируется ФЕП-карбоксилазой. Этот фермент в ходе реакции гидролизует фосфоэфирную связь в молекуле ФЕП, не используя АТФ. Для него показаны ингибирование малатом и аспартатом и активация со стороны ацетил-КоА. Регуляция во всех случаях носит аллостерический характер [54]. Синтезированная ЦУК, не обедняя пул метаболитов цикла Кребса, может использоваться в биосинтезе различных соединений. Известно, что штамм *E. coli* с дефектной ФЕП-карбоксилазой не способен расти на минимальной среде с глюкозой [24]. Принимая во внимание предыдущие факты, можно предположить, что сверхэкспрессия ФЕП-карбоксилазы приведет к увеличению продукции треонина. Значимость ФЕП-карбоксилазной реакции доказывает тот факт, что делеция гена *pps*, который кодирует фермент, снижает продукцию треонина на 87%, при том, что увеличение уровня экспрессии в 3 раза приводит к увеличению продукции на 28% [44]. Результаты похожей работы показали, что интеграция в хромосому дополнительной копии *pps* одновременно с другими модификациями приводит к увеличению продукции треонина на 36% [56].

Сверхэкспрессия *pps* также приводит к повышенной продукции сукцината в анаэробных условиях [25, 74]. Интересна работа, в ходе которой для увеличения продукции сукцината в *E. coli* была экспрессирована ФЕП-карбоксилаза из растения *Sorghum vulgare*, устойчивая к ингибированию малатом. Эта модификация позволила увеличить выход продукта в 3,5 раза [47].

Усилить синтез ЦУК можно также путем введения точечных замен в последовательность ФЕП-карбоксилазы. Известны несколько мутаций, десенсibiliзирующих ФЕП-карбоксилазу по отношению к малату и аспартату. Наилучшими характеристиками обладает замена лизина на серин в 620-м положении пептида. Белок с такой заменой был использован при конструировании продуцента аспартата на основе родственной по отношению к *E. coli* культуре *Pantonea ananatis* [13].

Неизвестны мутации, которые способны устранить зависимость от активации ацетил-КоА. Но такое ограничение можно обойти благодаря увеличению клеточного пула кофермента А. Это достигается посредством сверхэкспрессии гена *panK* (кодирует фермент пантотенаткиназу), который контролирует начальные пути синтеза кофермента А. При этом пантотеновая кислота должна быть внесена в среду [48]. Однако здесь необходима оценка рентабельности.

#### Использование ФТС совместно с пируваткарбоксилазой

Проблема недостаточного для продуцента треонина потока углерода через ФЕП и ЦУК может быть решена и другим способом (см. рис. 1В). В отличие от *E. coli*, у некоторых организмов за функцию анаплеротического образования ЦУК отвечает пируваткарбоксилаза. Интересно разделение функции образования ЦУК между ФЕП-карбоксилазой и пируваткарбоксилазой среди крупных таксонов: клетки грибов и животных содержат пируваткарбоксилазу, а клетки растений — ФЕП-карбоксилазу. При этом бактерии также могут содержать первый или второй фермент. Пируваткарбоксилаза, например, представлена у *Bacillus subtilis* [33]. В то же время некоторые микроорганизмы имеют оба фермента, что показано для *Corynebacterium glutamicum* [30, 60]. Сходство функции пируваткарбоксилазы и ФЕП-карбоксилазы подтверждается тем, что экспрессия гетерологичных пируваткарбоксилаз способна комплементировать делецию гена *pps* [35]. Из наиболее хорошо изученных нужно отметить ферменты из *Sinorhizobium meliloti* [13] и *Lactococcus lactis* [48, 71]. Для пируваткарбоксилазы из *Lactococcus lactis* показано увеличение активности в присутствии ацетил-КоА [48]. Аспартат не ингибирует активность, однако такое действие проявляется со стороны ЦУК [32].

Экспрессия гетерологичных пируваткарбоксилаз в клетках энтеробактерий в составе вектора или на

хромосоме ведет к увеличению продукции треонина и других аминокислот аспартатного семейства — аспартата, гомосерина, лизина и метионина. Кроме того, возрастает продукция глутамата, синтез которого связан с ЦУК опосредованно [13].

Эффект сверхэкспрессии гомологичной пируваткарбоксилазы на продукцию аминокислот аспартатного семейства продемонстрирован также на *Corynebacterium glutamicum* [1].

Неоднократно положительный эффект экспрессии пируваткарбоксилаз из *Rhizobium elti* и *Lactococcus lactis* был обнаружен на штаммах *E. coli*, продуцирующих сукцинат в анаэробных условиях [71, 73]. Более того, оказалось, что в определенных пределах продукция янтарной кислоты пропорциональна активности пируваткарбоксилазы. Кроме того, протекание реакции карбоксилирования пирувата приводит к увеличению накопления биомассы в расчете на единицу использованной глюкозы, что подтверждает увеличение потока углерода на биосинтез.

Из возможных недостатков второго подхода можно отметить в два раза меньшее изменение величины свободной энергии в пируваткарбоксилазной реакции по сравнению с ФЕП-карбоксилазной реакцией. Причина в том, что ФЕП — гораздо более энергоемкая молекула, чем АТФ ( $\Delta G = -61,9$  кДж/моль против  $-30,5$  кДж/моль для реакций гидролиза макроэргической связи в молекуле ФЕП и АТФ, соответственно). Следовательно, можно ожидать более медленного протекания пируваткарбоксилазной реакции при прочих равных условиях [55].

При использовании второго подхода в качестве переносчика глюкозы может быть использована ФТС. Поскольку ФТС является наиболее эффективным транспортером, возможно увеличение скорости транспорта глюкозы до значений выше, чем у штамма дикого типа. Этот эффект может быть достигнут различными способами. В первую очередь, это снятие репрессии с генов ФТС со стороны регуляторного белка Mlc. В отсутствие глюкозы в среде он находится в свободном состоянии и связывается с промоторными областями оперона *ptsHIcrr* и гена *ptsG*, контролирующих ФТС, репрессируя их. В случае присутствия глюкозы Mlc связывается с мембранным компонентом ФТС, не меняя его активности, и репрессия снимается [61].

Известно, что делеция гена *mlc* (make large colonies) приводит к тому, что штамм образует на среде с глюкозой гораздо более крупные колонии, чем штамм дикого типа за счет повышенного потребления глюко-

зы [38]. Показано также, что такой штамм обладает повышенной продукцией треонина [20]. Повышение экспрессии гена *mtfA* (Mlc titration factor) приводит к тому же эффекту [8], поскольку его продукт связывается с Mlc и, таким образом, снимает репрессию с генов ФТС [23].

Снятие эффекта Mlc также достигается отбором мутантных форм мембранного компонента ФТС, которые конститутивно связывают Mlc [10].

К похожим модификациям можно отнести усиление экспрессии гена *pagE*, кодирующего мембранный компонент ФТС, наиболее предпочтительным субстратом для которой является N-ацетилглюкозамин, но способной также переносить глюкозу. Это приводило к усилению продукции треонина, аргинина, триптофана и лизина [16].

### Заключение

Сопряжение системы ФТС в качестве основного транспортера глюкозы и реакции карбоксилирования ФЕП с образованием ЦУК в *E. coli* снижает максимальный теоретический выход треонина более чем вдвое. Данное ограничение справедливо и для других соединений, для которых ЦУК является непосредственным предшественником в пути биосинтеза. В литературе можно встретить два альтернативных подхода, позволяющих преодолеть данное ограничение. Первый основан на использовании ФЕП-независимого транспортера, тогда как второй требует присутствия анаплеротического фермента пируваткарбоксилазы.

К достоинствам первого подхода можно отнести использование реакции карбоксилирования ФЕП как более эффективной с точки зрения термодинамических характеристик, чем пируваткарбоксилазная реакция. Напротив, преимуществом второго подхода является использование более эффективного с точки зрения сродства к субстрату и кинетики транспортера глюкозы, ФТС. До настоящего момента не было предпринято попытки сравнить обе системы в идентичном генетическом окружении. Справедливо также отметить, что описанные подходы не являются взаимоисключающими и, возможно, оптимальный штамм-продуцент может быть получен посредством комбинации обеих стратегий.

*Исследование проводилось при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Государственного контракта № 16.522.12.2013.*

### Литература

1. Айкманнс Б., Ридель К., Зам Г., Меккель Б. Полину-клеотид, кодирующий фосфоенолпируваткарбоксикиназу, и зонд, предназначенный для его получения // Патент РФ RU2262532, С12N15/00. 2005.
2. Альтман И.Б., Птицын Л.Р. Способ получения L-треонина с использованием бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, в которой инактивирован ген *lghA* // Патент РФ RU2337956, С12N1/21, С12P13/04, С12R1/19. 2008.
3. Ахвердян В.З., Саврасова Е.А., Каплан А.М., Лобанов А.О., Козлов Ю.И. Способ получения L-треонина, штамм *Escherichia coli* — продуцент треонина (варианты) // Патент РФ RU2244007, С12P13/08, С12N1/21, С12N1/21, С12R1/19. 2005.
4. Биндер Т.П., Брэдишоу Д.С., Ванг М.Д., Лио Х.Д., Свишер С.Л., Хэнк П.Д. Штамм микроорганизма *Escherichia coli* — продуцент L-треонина, способ получения продуцирующего L-треонин штамма *E. coli* и способ получения L-треонина (варианты) // Патент РФ RU2212448, С12N15/52, С12N1/21, С12P13/08, С12N1/21, С12R1/19. 2003.
5. Гусятинер М.М., Жданова Н.И., Лившиц В.А., Заиграева Г.Г., Шакулов Р.С. Исследование функции гена *relA* в выражении аминокислотных оперонов. II. Влияние аллельного состояния гена *relA* на сверхсинтез треонина мутантом *Escherichia coli* K-12, устойчивым к  $\beta$ -оксинорвалину // Генетика. — 1978. — Vol. 14. — No. 6. — P. 957–968.
6. Гусятинер М.М., Ивановская Л.В., Леонова Т.В., Муханова Е.И., Ростова Ю.Г., Филиппов Д.В., Чудакова Д.А. Мутантная глутаминсинтетаза, фрагмент ДНК, штамм *Escherichia coli* — продуцент L-глутамин и способ получения L-аминокислот // Патент РФ RU2230114, С12N1/21, С12N9/10, С12N15/11, С12P13/14, С12N1/21, С12R1/19. 2003.
7. Закатаева Н.П., Кутукова Е.А., Тройский С.В., Трошин П.В., Лившиц В.А., Алешин В.В. Экспорт метаболитов белками семейств DMТ и RhtV и их возможная роль в межклеточной коммуникации // Микробиология. — 2006. — Vol. 75. — No. 4. — P. 509–520.
8. Кирюхин М.Ю., Гусятинер М.М. Способ получения L-аминокислот с использованием бактерии семейства *Enterobacteriaceae* // Заявка на Патент РФ RU2010129270, С12N1/00. 2012.
9. Кодзима Х., Тоцука К. Способ получения L-аминокислоты // Патент РФ RU2182173, С12P13/04, С12N1/21, С12N15/53, С12N1/21, С12R1/19. 1998.
10. Котлярова В.А., Птицын Л.Р., Альтман И.Б., Козлов Ю.И. Мутантная ПВ/ПС субъединица глюкозоспецифической пермеазы системы PTS, фрагмент ДНК, бактерия, принадлежащая к роду *Escherichia*, — продуцент L-треонина и способ получения L-треонина // Патент



- РФ RU2335536, C12N1/21, C12P13/04, C12R1/19. 2008.
11. *Леонова Т.В., Ивановская Л.В., Ростова Ю.Г., Ворошилова Э.Б., Гусятинер М.М.* Способ получения L-аминокислоты семейства глутамата или L-валина с использованием бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia* // Патент РФ RU2418064, C12N1/21, C12P13/04. 2011.
  12. *Лившиц В.А., Шакулов Р.С., Заиграева Г.Г., Гусятинер М.М., Жданова Н.И.* Исследование функции гена *relA* в выражении аминокислотных оперонов. I. Влияние аллельного состояния гена *relA* на фенотипическое проявление мутаций ауксотрофности по треонину и изолейцину у *Escherichia coli* K-12 // Генетика. – 1978. – Т. 14. – № 6. – Р. 947–956.
  13. *Мохова О.Н., Куваева Т.М., Голубева Л.И., Колоколова А.В., Каташкина Ж.И.* Бактерия, принадлежащая к роду *Rantoea*, – продуцент L-аспартата или метаболита, являющегося производным L-аспартата, и способ получения L-аспартата или метаболита, являющегося производным L-аспартата // Патент РФ RU2411289, C12N1/20. 2010.
  14. *Наканиси К., Кодзима Д., Сузуки Т., Нисимура Я., Кодзима Х.* Способ получения L-лизина // Патент РФ RU2224793, C12N1/21, C12P13/08, C12N1/21, C12R1/19. 2004.
  15. *Пак Д.У., Ли Б.Ч., Ким Д.Ч., Ли Д.Х., Чо Д.У., Пак У.Х.* Способ получения L-треонина // Патент РФ RU2288265, C12N15/00, C12N15/11, C12N1/21, C12P13/08, C12R1/19. 2006.
  16. *Птицын Л.Р., Альтман И.Б., Котлярова В.А., Козлов Ю.И.* Способ получения L-аминокислот с использованием бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia* // Патент РФ RU2312893, C12N1/21, C12P13/04, C12R1/19. 2007.
  17. *Рыбак К.В., Сливинская Е.А., Саврасова Е.А., Казиева Е.Д., Ахвердян В.Э.* Способ получения L-треонина с использованием бактерии, принадлежащей к роду *Escherichia*, в которой инактивирован ген *ltaE* // Патент РФ RU2304166, C12N1/21, C12P13/08, C12R1/19. 2007.
  18. *Рыбак К.В., Филиппов Д.В., Ворошилова Э.Б.* Способ получения L-аминокислот с использованием бактерии семейства *Enterobacteriaceae* // Заявка на Патент РФ RU2005109258, C12N1/21, C12P13/04, C12R1/19. 2006.
  19. *Сливинская Е.А., Рыбак К.В., Каташкина Ж.И., Машко С.В., Козлов Ю.И.* Конститутивный синтез в *Escherichia coli* низкоаффинных H<sup>+</sup>-симпортеров D-галактозы (GalP), D-ксилозы (XylE) или L-фукозы (FucP) приводит к возможности эффективного роста PTS-штаммов на среде с D-глюкозой // Биотехнология. – 2007. – Т. 5. – С. 24–37.
  20. *Стойнова Н.В., Сычева Е.В., Скороходова А.Ю., Козлов Ю.И.* Способ получения L-аминокислоты, штамм *Escherichia coli* TDH7mlc::cat/pPRT614 – продуцент L-треонина // Патент РФ RU2245919, C12N1/21, C12P13/04, C12N1/21, C12R1/19. 2005.
  21. *Aguilar C., Escalante A., Flores N., Anda R. de, Riveros-McKay F., Gosset G., Morett E., Bolivar F.* Genetic changes during a laboratory adaptive evolution process that allowed fast growth in glucose to an *Escherichia coli* strain lacking the major glucose transport system // BMC Genomics. – Vol. 13:385. doi:10.1186/1471-2164-13-385
  22. *Baez-Viveros J.L., Osuna J., Hernandez-Chavez., Soberon X., Bolivar F., Gosset G.* Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in *Escherichia coli* // Biotechnol. Bioeng. – 2004. – Vol. 87. – No. 4. – Р. 516–524.
  23. *Becker A.K., Staab A., Boos W., Morita T., Aiba H., Titgemeyer F., Jahreis K.* YeeI, a novel protein involved in modulation of the activity of the glucose-phosphotransferase system in *Escherichia coli* K-12 // J. Bacteriol. – 2006. – Vol. 188. – No. 18. – Р. 5439–5449.
  24. *Blattner F.R., Plunkett G., 3<sup>rd</sup>, Bloch C.A., Perna N.T., Burland M., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 // Science. – 1997. – Vol. 277. – No. 5331. – Р. 1453–1462.
  25. *Chatterjee R., Millard C.S., Champion K., Clark D.P., Donely M.I.* Mutation of the *ptsG* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli* // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – Vol. 67. – No. 1. – Р. 148–154.
  26. *Coomes M.W., Mitchel B.K., Beezley A., Smith T.E.* Properties of an *Escherichia coli* mutant deficient in phosphoenolpyruvate carboxylase catalytic activity // J. Bacteriol. – 1985. – Vol. 164. – No. 2. – Р. 646–652.
  27. *Datsenko K.A., Wanner B.L.* One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products/K.A. Datsenko // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – No. 12. – Р. 6640–6645.
  28. *Debabov V.G., Kozlov J.I.* Bacterial strain of *Escherichia coli* ВКПМ В-3996 as the producer of L-threonine // US Patent US5175107, C12N1/20, C12N1/21, C12N15/00, C12N15/01, C12N15/09, C12N15/11, C12N15/52, C12N15/70, C12P13/08, C12R1/19, C12N1/21, C12N15/70, C12P13/08. 1992.
  29. *Debabov V.G., Kozlov J.I., Khurges E.M., Lifshits V.A., Zhdanova N.I., Gusyatiner M.M., Sokolov A.K., Bachina T.A., Christoserdov A.Y., Tsigankov U.D., Yankovsky N.K., Mashko S.V., Lapidus A.L., Gavrilova O.F., Rodionov O.A.* L-threonine-producing microbacteria and a method for the production of L-threonine // US Patent US6132999, C12N1/21, C12N15/52, C12N15/73, C12P13/08,

- C07H21/04, C12N1/21, C12N15/70, C12N15/73, C12P13/08. 2000.
30. *Delaunay S., Uy D., Baucher M.F., Engasser J.M., Guyonvarch A., Goergen J.L.* Importance of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Corynebacterium glutamicum* during the temperature triggered glutamic acid fermentation // *Metab. Eng.* – 1999. – Vol. 1. – No. 4. – P. 334–343.
  31. *Diesveld R., Tietze N., Furst O., Reth A., Bathe ., Sahn H., Eggeling L.* Activity of exporters of *Escherichia coli* in *Corynebacterium glutamicum*, and their use to increase L-threonine production // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 16. – No. 3–4. – P. 198–207.
  32. *Dunn M.F., Araiza G., Finan T.M.* Cloning and characterization of the pyruvate carboxylase from *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 // *Arch. Microbiol.* – 2001. – Vol. 176. – No. 5. – P. 355–363.
  33. *Fisher K.E., Eisenstein E.* An efficient approach to identify *ilvA* mutations reveals an amino-terminal catalytic domain in biosynthetic threonine deaminase from *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 1993. – Vol. 175. – No. 20. – P. 6605–6613.
  34. *Flores N., Flores S., Escalante A., Ande R. de, Leal L., Malpica R., Georgellis D., Gosset G., Bolivar F.* Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system // *Metab. Eng.* – 2005. – Vol. 7. – No. 2. – P. 70–87.
  35. *Gokarn R.R., Eiteman M.A., Altman E.* Expression of pyruvate carboxylase enhances succinate production in *Escherichia coli* without affecting glucose uptake // *Biotechnol. Lett.* – 1998. – Vol. 20. – No. 8. – P. 795–798.
  36. *Gosset G.* Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system // *Microb. Cell. Fact.* – 2005. – Vol. 4:14. doi:10.1186/1475-2859-4-14
  37. *Hernandez-Montalvo V., Martinez A., Hernandez-Chavez G., Bolivar F., Valle F., Gosset G.* Expression of *galP* and *glk* in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products // *Biotechnol. Bioeng.* – 2003. – Vol. 83. – No. 6. – P. 687–694.
  38. *Hosono K., Kakuda H., Ichihara S.* Decreasing accumulation of acetate in a rich medium by *Escherichia coli* on introduction of genes on a multicopy plasmid // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 1995. – Vol. 59. – No. 2. – P. 256–261.
  39. *Kim Y.M., Ogawa W., Tamai E., Kuroda T., Mizushima T., Tsuchiya T.* Purification, reconstitution, and characterization of Na(+)/serine symporter, SstT, of *Escherichia coli* // *J. Biochem.* – 2002. – Vol. 132. – No. 1. – P. 71–76.
  40. *Kolisnychenko V., Plunkett G., 3<sup>rd</sup>, Herring C.D., Feher T., Posfai J., Blattner F.R., Posfai G.* Engineering a reduced *Escherichia coli* genome // *Genome Res.* – 2002. – Vol. 12. – No. 4. – P. 640–647.
  41. *Kruse D., Kramer R., Eggeling L., Rieping M., Pfefferle W., Tchieu J.H.* Influence of threonine exporters on threonine production in *Escherichia coli* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 59. – No. 2–3. – P. 205–210.
  42. *Lee J.H., Lee D.E., Lee B.U., Kim H.S.* Global analyses of transcriptomes and proteomes of a parent strain and an L-threonine-overproducing mutant strain // *J. Bacteriol.* – 2003. – Vol. 185. – No. 18. – P. 5442–5451.
  43. *Lee J.H., Sung B.H., Kim M.S., Blattner F.R., Yoon B.H., Kim Y.H., Kim S.C.* Metabolic engineering of a reduced-genome strain of *Escherichia coli* for L-threonine production // *Microb. Cell. Fact.* – 2009. – Vol. 8. – P. 2–13.
  44. *Lee K.H., Park J.H., Kim T.Y., Kim H.U., Lee S.Y.* Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production // *Mol. Syst. Biol.* – 2007. – Vol. 3:149. doi:10.1038/msb4100196.
  45. *Lee M.H., Lee H.W., Park J.H., Ahn J.K., Jung J.K., Hwang Y.I.* Improved L-threonine production of *Escherichia coli* mutant by optimization of culture conditions // *J. Biosci. Bioeng.* – 2006. – Vol. 101. – No. 2. – P. 127–130.
  46. *Lengsfeld C., Schonert R., Dippel R., Boos W.* Glucose- and glucokinase-controlled mal gene expression in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 2009. – Vol. 191. – No. 3. – P. 701–712.
  47. *Lin H., San K.Y., Bennet G.N.* Effect of *Sorghum vulgare* phosphoenolpyruvate carboxylase and *Lactococcus lactis* pyruvate carboxylase coexpression on succinate production in mutant strains of *Escherichia coli* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 67. – No. 4. – P. 515–523.
  48. *Lin H., Vadali R.V., Bennet G.N., San K.Y.* Increasing the acetyl-CoA pool in the presence of overexpressed phosphoenolpyruvate carboxylase or pyruvate carboxylase enhances succinate production in *Escherichia coli* // *Biotechnol. Prog.* – 2004. – Vol. 20. – No. 5. – P. 1599–1604.
  49. *Lindner S.N., Niederholtmeyer H., Smitz K., Schoberth S.M., Wendisch V.F.* Polyphosphate/ATP-dependent NAD kinase of *Corynebacterium glutamicum*: biochemical properties and impact of *ppnK* overexpression on lysine production // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 87. – No. 2. – P. 583–593.
  50. *Liu J.Q., Dairi T., Itoh N., Kataoka M., Shimizu S., Yamada H.* Gene cloning, biochemical characterization and physiological role of a thermostable low-specificity L-threonine aldolase from *Escherichia coli* // *Eur. J. Biochem.* – 1998. – Vol. 255. – No. 1. – P. 220–226.
  51. *McDonald T.P., Walmsley A.R., Henderson P.J.* Asparagine 394 in putative helix 11 of the galactose-H<sup>+</sup> symport protein (*GalP*) from *Escherichia coli* is associated with the internal binding site for cytochalasin B and sugar // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – No. 24. – P. 15189–15199.

52. Mizoguchi H., Mori H., Fujio T. Escherichia coli minimum genome factory // Biotechnol. Appl. Biochem. — 2007. — Vol. 46(Pt 3). — P. 157–167.
53. Mizoguchi H., Sawano Y., Kato J., Mori H. Superpositioning of deletions promotes growth of Escherichia coli with a reduced genome // DNA Res. — 2008. — Vol. 15. — No. 5. — P. 277–284.
54. Morikawa M., Izui K., Taguchi M., Katsuki H. Regulation of Escherichia coli phosphoenolpyruvate carboxylase by multiple effectors in vivo. Estimation of the activities in the cells grown on various compounds // J. Biochem. — 1980. — Vol. 87. — No. 2. — P. 441–449.
55. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of biochemistry. 4<sup>th</sup> ed. — New York: W. H. Freeman and Company, 2004. — 1100 p.
56. Noh K.S., Kim Y.C., Park J.Y., Kim D.C., Lee J.H., Ok S.H. Method for L-threonine production//US Patent US7011961, C07H21/04, C12N1/20, C12N1/21, C12N15/09, C12P13/08, C12R1/19, C12N1/00, C12N15/00, C12N9/00. 2006.
57. Ogawa W., Kim Y.M., Mizushima T., Tsuchiya. Cloning and expression of the gene for the Na<sup>+</sup>-coupled serine transporter from Escherichia coli and characteristics of the transporter // J. Bacteriol. — 1998. — Vol. 180. — No. 24. — P. 6749–6752.
58. Okamoto K., Kino K., Ikeda M. Hyperproduction of L-threonine by an Escherichia coli mutant with impaired L-threonine uptake // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 1997. — Vol. 61. — No. 11. — P. 1877–1882.
59. Park Y.H., Lee B.C., Cho K.M., Kim D.C., Shin Y.U., Lee J.H. Microorganism producing L-threonine having inactivated galR gene, method of producing the same and method of producing L-threonine using the microorganism // US Patent US7229794, C07K14/245, C12N1/20, C12P1/00, C12P13/08, C12P21/04. 2007.
60. Peters-Wendisch P.G., Kreutzer C., Kalinowski J.R., Sahm H., Eikmanns B.J. Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: characterization, expression and inactivation of the pyc gene // Microbiology. — 1998. — Vol. 144. — No. 4. — P. 915–927.
61. Plumbridge J. Regulation of gene expression in the PTS in Escherichia coli: the role and interactions of Mlc // Curr. Opin. Microbiol. — 2002. — Vol. 5. — No. 2. — P. 187–193.
62. Posfai G., Plunkett G., 3<sup>rd</sup>, Feher T., Frisch D., Keil G.M., Umenhoffer K., Kolisnychenko V., Stahl B., Sharma S.S., Arruda M. de, Burland V., Harcum S.W., Blattner F.R. Emergent properties of reduced-genome Escherichia coli // Science. — 2006. — Vol. 312. — No. 5776. — P. 1044–1046.
63. Postma P.W., Lengeler J.W., Jacobson G.R. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems: Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology. 2<sup>nd</sup> ed. (ed. F.C. Neidhardt). — Washington, DC: ASM Press, 1996. — P. 1149–1174.
64. Ren C., Chen T., Zhang J., Liang L., Lin Z. An evolved xylose transporter from Zymomonas mobilis enhances sugar transport in Escherichia coli // Microb. Cell. Fact. — 2009. — Vol. 8:66. doi:10.1186/1475-2859-8-66.
65. Saffen D.W., Presper K.A., Doering T.L., Roseman S. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Molecular cloning and structural analysis of the Escherichia coli ptsH, ptsI, and crr genes // J. Biol. Chem. — 1987. — Vol. 262. — No. 33. — P. 16241–16253.
66. Saier M.H., Jr. A functional-phylogenetic system for the classification of transport proteins // J. Cell. Biochem. — 1999. — Suppl. 32–33. — P. 84–94.
67. Shen C.R., Liao J.C. Metabolic engineering of Escherichia coli for 1-butanol and 1-propanol production via the keto-acid pathway // Metab. Eng. — 2008. — Vol. 10. — No. 6. — P. 312–320.
68. Simic P., Willuhn H., Sahm H., Eggeling L. Identification of glyA (encoding serine hydroxymethyltransferase) and its use together with the exporter ThrE to increase L-threonine accumulation by Corynebacterium glutamicum // Appl. Environ. Microbiol. — 2002. — Vol. 68. — No. 7. — P. 3321–3327.
69. Snoep J.L., Arfman N., Yomano L.P., Fliege T., Conway T., Ingram L.O. Reconstruction of glucose uptake and phosphorylation in a glucose-negative mutant of Escherichia coli by using Zymomonas mobilis genes encoding the glucose facilitator protein and glucokinase // J. Bacteriol. — 1994. — Vol. 176. — No. 7. — P. 2133–2135.
70. Sumantran V.N., Schweizer H.P., Datta P. A novel membrane-associated threonine permease encoded by the tdcC gene of Escherichia coli // J. Bacteriol. — 1990. — Vol. 172. — No. 8. — P. 4288–4294.
71. Thakker C., Zhu J., San K.Y., Bennet G. Heterologous pyc gene expression under various natural and engineered promoters in Escherichia coli for improved succinate production // J. Biotechnol. — 2011. — Vol. 155. — No. 2. — P. 236–243.
72. Valle F., Munoz E., Ponce E., Flores N., Bolivar F. Basic and applied aspects of metabolic diversity: the phosphoenolpyruvate node // J. Ind. Microbiol. — 1996. — Vol. 17. — P. 458–462.
73. Vemuri G.N., Eiteman M.A., Altman E. Succinate production in dual-phase Escherichia coli fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2002. — Vol. 28. — No. 6. — P. 325–332.
74. Wang Q., Wu C., Chen T., Chen X., Zhao X. Expression of galactose permease and pyruvate carboxylase in Escherichia coli ptsG mutant increases the growth rate and succinate yield under anaerobic conditions // Biotechnol. Lett. — 2006. — Vol. 28. — No. 2. — P. 89–93.
75. Weisser P., Kromer R., Sahm H., Sprenger G.A. Functional expression of the glucose transporter of Zymomonas mobilis leads to restoration of glucose and fructose uptake in

- Escherichia coli* mutants and provides evidence for its facilitator action // *J. Bacteriol.* – 1995. – Vol. 177. – No. 11. – P. 3351–3354.
76. Yi J., Draths K.M., Li K., Frost J.W. Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E. coli* // *Biotechnol. Prog.* – 2003. – Vol. 19. – No. 5. – P. 1450–1459.
77. Ziegler P. Process for the fermentative preparation of L-amino acids using coryneform bacteria // US6596516, C12N1/21, C12N15/01, C12N15/09, C12N15/31, C12N15/54, C12N9/10, C12N9/99, C12P13/04, C12P13/08, C12R1/15, C12R1/19, C12N1/21, C12N15/01, C12P13/04, C12P13/06, C12P13/08. 2003.

## OPTIMIZATION OF GLUCOSE TRANSPORT PATHWAYS AND OXALOACETIC ACID SYNTHESIS IN DESIGNING THREONINE PRODUCING BACTERIAL STRAINS

D.M. BUBNOV, T.V. YUZBASHEV, I.T. GVILAVA, S.P. SINEOKY

*State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow*

Arrangement of glucose transport and oxaloacetic acid synthesis in wildtype *E. coli* strains are limiting more than twice maximum theoretical conversion of glucose into threonine and other metabolites, derivatives of phosphoenolpyruvate. It can be distinguished two fundamental approaches that allow to overcome this limitation. First, mechanism of glucose transport across the cytoplasmic membrane of the cell may be subjected to modifications. Replacement of main glucose transport system, phosphotransferase system, to alternative phosphoenolpyruvate-independent carriers leads to increased production of aspartate family amino acids, aromatic amino acids and succinate. Increased production of the same metabolites unless aromatic amino acids as well as arginine and glutamate can be achieved by using other approach, which implies the using of native transport system together with supplementation by heterologous enzyme pyruvate carboxylase. In this review, we tried to make out individual cases of the use of the first and second approach in the design of strains of biotechnological purposes, as well as to compare the two strategies in terms of their effectiveness.

*Keywords:* *Escherichia coli*, threonine producing strain, phosphotransferase system, PEP-independent glucose transport, pyruvate carboxylase.

# МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЭТИОПАТОГЕНЕЗА И ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА: ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОГРАММ ПРОФИЛАКТИКИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

А.Т. АСРАТОВ<sup>1,2\*</sup>, А.А. КОСТИН<sup>1,2</sup>, О.И. ТРУШИНА<sup>1</sup>, А.Д. КАПРИН<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» Минздрава России,

<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов» Минобрнауки России, Москва

В обзоре рассматриваются современные данные об этиопатогенезе и молекулярной диагностике ВПЧ-инфекции в связи с реализацией профилактических программ ведения больных раком шейки матки. Делается акцент на появившейся в последнее время доказательной базе, которая обосновывает преимущества ДНК ВПЧ-тестирования перед традиционными цитологическими и визуальными скрининговыми исследованиями.

**Ключевые слова:** вирус папилломы человека, рак шейки матки, этиопатогенез, молекулярная диагностика, скрининговые программы.

## Введение

Современная медицина характеризуется тенденцией к интеграции различных научно-практических направлений, включая такие, как онкоурология, онкогинекология и др. В рамках этих направлений одной из приоритетных проблем стало изучение теоретических, методологических и практических аспектов рака шейки матки (РШМ).

В настоящее время показана роль онкогенных типов вируса папилломы человека (ВПЧ) в процессах опухолевой трансформации эпителия шейки матки. В связи с этим проблема РШМ выходит в предметную область общей и частной вирусологии, а также в область, связанную с решением вопросов папилломавирусной инфекции (ПВИ), в частности, и инфекций, передаваемых половым путем (ИППП) в целом. В широком же смысле, в связи с внедрением новейших биохимических и генетических методов, проблема перемещается в сферу молекулярной биологии.

В контексте данной темы имеется большая литература экспериментального, клинического, обзорного и

аналитического характера, базирующаяся на исследованиях, выполненных в России и за рубежом [2, 15, 17–19, 21, 22, 27, 31, 47, 48, 55, 67, 70]. Прежде всего, следует остановиться на обобщенных эпидемиологических данных национального и международного уровней, в том числе ВОЗ. Согласно статистике ВОЗ, РШМ встречается у более полумиллиона женщин. Среди ИППП на первое место выходит ПВИ, причем отмечается, что эта инфекция диагностируется у более 50% сексуально активных женщин [13]. Накоплена значительная информация об ультраструктурной организации и геномной структуре ВПЧ. Среди отечественных вирусологов этому вопросу наибольшее внимание было уделено О.И. Киселевым [7, 8].

Сейчас бурно развивается направление, связанное с молекулярно-биологическими основами ПВИ и ВПЧ и их ролью в онкогенезе. Задача настоящего исследования — проанализировать и обобщить последние данные такого характера об этиопатогенезе и диагностике ВПЧ-инфекции в связи с реализацией профилактических программ РШМ.

## Общие сведения о ВПЧ

Выявлено существование в природе более 100 типов ВПЧ, из них более 30 вызывают заболевания аногенитальной сферы. Большинство ВПЧ-инфекций вызывает нарушения низкой степени, которые элиминируются в 90% случаев, а в менее 10% развиваются в повреждения

© 2014 г. Асратов А.Т., Костин А.А., Трушина О.И., Каприн А.Д.

\* **Автор для переписки:**

Асратов А.Т.

аспирант, МНИОИ им. П.А. Герцена, РУДН

125284 Москва, 2-й Боткинский пр., 3

E-mail: dr.asad1982@yandex.ru

высокой степени или инвазивный рак. К патологии шейки матки имеют наибольшее отношение высокоонкогенные типы 16 и 18 (считается, что они ответственны за возникновение более 75% случаев РШМ). ВПЧ принадлежит к семейству паповавирусов. Этот вирус содержит двухнитевую кольцевую ДНК. Установлено, что геном ВПЧ кодирует два «поздних» белка оболочки вируса (L1 и L2) и 6 так называемых «ранних» белков (E1, E2, E4–E7), необходимых для репликации ДНК вируса и сборки вновь образованных вирусных частиц в инфицированных клетках (рис. 1). [30].

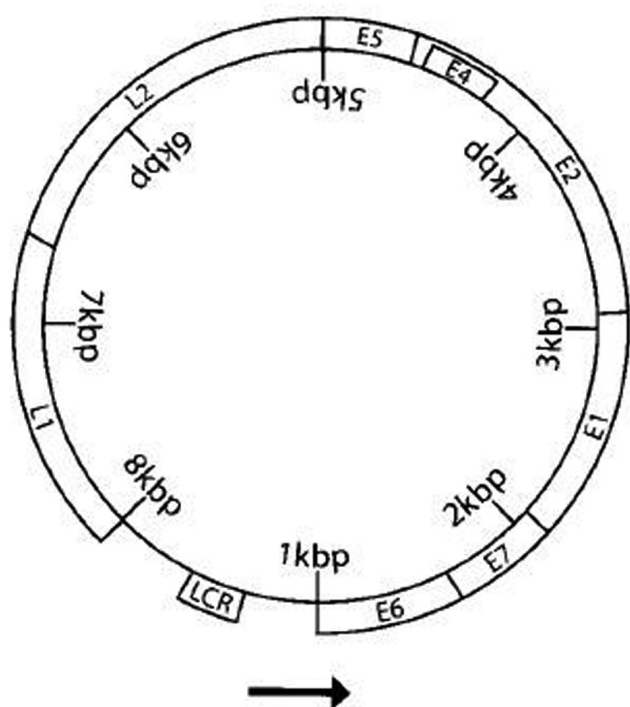


Рис. 1. Схема генома ДНК ВПЧ [30]

Исследований по молекулярно-биологическим основам ПВИ в целом и ПВЧ-инфекции, в частности, очень много. Они обобщены в ряде обзоров, руководств, контролируемых исследований и мета-анализов [25, 26, 37, 40, 52, 57, 59, 65, 71].

Специалистами принято считать, что скрининговые программы, основанные на цитологической диагностике (Пап-тест), привели в последней четверти XX века к существенному снижению заболеваемости РШМ в развитых странах [14]. Тем не менее смертность от РШМ остается на втором месте среди онкологических заболеваний у женщин всего мира (третья причина смерти от рака у женщин). Поэтому в связи с актуальностью проблемы и методическим прогрессом (особенно открытием ПЦР) молекулярно-генетическая диагностика ВПЧ как ведущего этиопатогенетического фактора

получила интенсивное развитие в последнее время, что привело к двум важным достижениям. Во-первых, это связано с вакцинацией 15–25-летних женщин, которая обеспечивает почти 100%-ную профилактику персистирующей генитальной инфекции и РШМ, вызванного типами 16 и 18 ВПЧ. Во-вторых, активное внедрение молекулярно-биологического тестирования ВПЧ в скрининговые программы женщин старше 30 лет позволило диагностировать цервикальную интраэпителиальную неоплазию (ЦИН) высокой степени раньше, чем с помощью Пап-теста.

### Этиопатогенез рака шейки матки

История раскрытия этиологии РШМ восходит к основополагающей работе Харальда цур Хаузена 1976 года [73]. В ней он поставил в причинную связь появление РШМ от ВПЧ. Позднее в 1983 году немецкий исследователь идентифицировал в опухоли наличие ДНК ВПЧ типов 16 и 18. Вначале его взгляды не находили поддержки у специалистов, однако в конце концов его правота была доказана многочисленными исследованиями. За это открытие Х. цур Хаузен был удостоен в 2008 году Нобелевской премии [74] (совместно с французскими вирусологами Люком Монтанье и Франсуазой Барее-Синусси, которые получили свою половину премии за открытие вируса иммунодефицита человека).

Надо отметить, что вирусная теория раковых заболеваний еще задолго до цур Хаузена была развита отечественным ученым Л.А. Зильбером, а также зарубежными исследователями, лауреатами Нобелевской премии Ф. Раусом, Р. Дульбекко [36], Х.М. Теминим, Д. Балтимором (рис. 2).

К настоящему времени вопросы этиопатогенеза РШМ разработаны достаточно глубоко и всесторонне [18, 26, 53]. Показана причинная роль ВПЧ в генезе всех видов РШМ — это продемонстрировано в биологическом и эпидемиологическом аспектах. Однако большинство современных исследователей придерживается сравнительно осторожной формулировки: ВПЧ необходим, но не достаточен для возникновения РШМ. В связи с этим определенная роль отводится кофакторам (или факторам риска).

Отдельно взятая монокаузальная роль ВПЧ в развитии РШМ четко прослежена на уровне патогенеза. Вирус проникает через наружную мембрану базальных эпителиальных клеток с помощью опосредованного рецептором эндоцитоза.

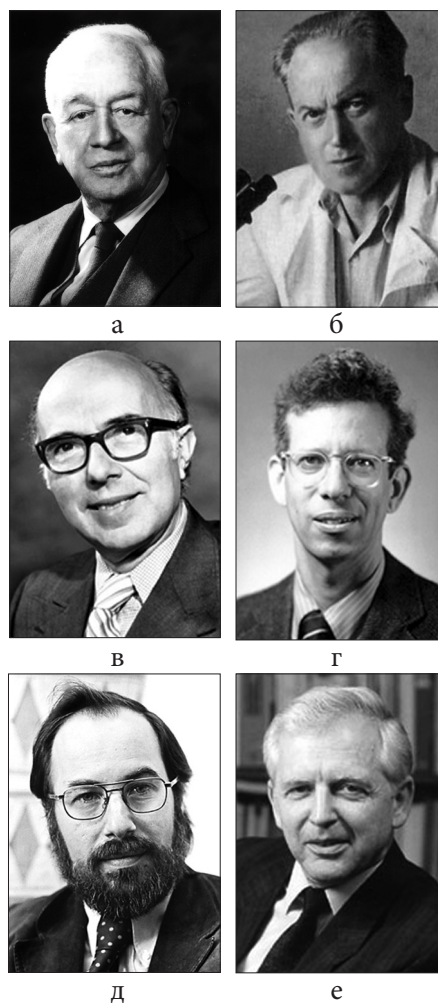


Рис. 2. Основоположники онковирусологии: а – Раус, б – Зильбер, в – Дульбекко, г – Темин, д – Балтимор, е – цур Хаузен

Далее наступает первый этап цикла репликации ВПЧ, во время которого нарабатывается примерно 100 копий вирусного генома, что позволяет тем не менее сохранять у инфицированной клетки способность к размножению. На втором этапе базальные клетки теряют эту способность, а ВПЧ начинают усиленно реплицироваться и выделяться в окружающую среду, дезинтегрируя эпителиальные клетки. Для репликации ВПЧ существенное значение имеют белки вируса Е6 и Е7, взаимодействующие с рядом клеточных белков. Е6 играет ключевую роль во взаимодействии и деградации белка р53, имеющего значение для защиты нормальных клеток от стресса (известно его название как «хранитель генома»). Е7 связывает и деградирует белок ретинобластомы рRb [49]. Е5 тормозит запрограммированную клеточную гибель. Весь процесс в итоге ведет к онкотрансформации клеток [12, 53].

Определена градация типов ВПЧ по степени онкогенности. Есть распространенная классификация на два основных типа: высокого риска и низкого риска. К

онкогенным вирусам высокого риска относят типы: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82. В группу неонкогенных или низкого риска ВПЧ включают типы 6, 11, 40, 42, 43, 49, 54, 61, 70, 72, 81. Имеется также более расширенное разделение на три группы (табл. 1). Оно проведено Munoz N. et al. (2006) [53] на основании адаптированных материалов [52, 65].

Таблица 1

### Классификация аногенитальных типов ВПЧ [53]

Степень	Тип риска
Высокая	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
Вероятно высокая	26, 53, 66
Низкая	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, СР6108

Таким образом, 15 типов ВПЧ идентифицируются как типы высокого риска, 3 – вероятно высокого риска, 12 – низкого риска.

### Методы выявления ВПЧ

Молекулярно-биологические методы диагностики ВПЧ-инфекции вышли на передний план в связи с невозможностью культивирования этого вируса и отсутствием надежных серологических подходов. Тестирование на ВПЧ проводится с целью обнаружения женщин с риском развития РШМ. Это осуществляется при первичном скрининге шейки матки, скрининге женщин с низкой степенью плоскоклеточного интраэпителиального поражения, для прослеживания динамики после лечения этого поражения, при скрининге шейки матки перед вакцинацией.

К числу методов, нацеленных на выявление ВПЧ, относятся несколько категорий:

- методы амплификации мишени (ПЦР);
- методы сигнал-амплифицированной гибридизации (в основном метод гибридного захвата: Hybrid capture assays – hc2);
- методы прямой (или неамплифицированной) гибридизации (Southern transfer hybridization – STH).

**Метод ПЦР.** Технические детали этого метода общеизвестны. Поэтому в данной статье внимание будет уделяться больше фактам, имеющим клиническое значение. Выявление ВПЧ посредством ПЦР может

проводиться или с помощью праймеров, специфических для типа и предназначенных только для отдельного генотипа ВПЧ, или с помощью консенсусных (general PCR) пар праймеров, служащих для амплификации широкого спектра генотипов ВПЧ (типа PGMY09/PGMY1 и GP5+/GP6+) [51, 69].

Отечественные специалисты используют наборы реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-FL» и «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL», производимые ЦНИИ эпидемиологии.

При постановке ПЦР следует принимать меры по исключению ложно-положительности (равно как и ложно-негативности) реакции [24].

Метод ПЦР в режиме реального времени также показал свою эффективность. Он имеет ряд преимуществ, поскольку позволяет определять вирусную нагрузку, проводить ПЦР в комбинации с флуорохромами, можно работать с очень малыми концентрациями ДНК [72].

Имеются данные по применению обратной транскриптазы при проведении ПЦР (метод RT-PCR) [51].

**Метод сигнал-амплифицированной гибридизации.** Метод *Hybrid capture assays (hc2)* представляет собой стандартный метод, широко применяемый во всем мире [32]. Он основан на гибридизации мишени ВПЧ-ДНК с меченой РНК в растворе. Полученные РНК-ДНК гибриды захватываются на стенках микропанелей и выявляются специфическими моноклональными антителами и хемилюминесцентным субстратом.

Метод дает возможность проводить полуколичественную оценку ВПЧ-ДНК. Используются два зонда: синтетические РНК, комплементарные геномной последовательности 13 типов ВПЧ высокого риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) и 5 типов низкого риска (6, 11, 42, 43, 44) — их принято называть «коктейлями». Указанный набор высокоонкогенных и низкоонкогенных типов ВПЧ предложен в разрешенной FDA тест-системе Digene®. В другой тест-системе (Cervista®) используется 14 типов ВПЧ высокого риска — добавлен номер 66) [25, 41]; ее чувствительность составляет 100% при ЦИН3 и 98% — при ЦИН2 [42].

Это — стандартный метод, широко применяемый во всем мире. Метод hc2 имеет некоторые ограничения. Так, он позволяет различать группы высокого и низкого риска, однако не может идентифицировать специфические генотипы ВПЧ. Метод (из-за предельных возможностей 5000 геномов) менее чувствителен, чем ПЦР.

Отмечается также кросс-реактивность между двумя зондами. Наблюдается значительное число ложно-положительных реакций (10—19%). Требуется достаточно большой объем проб для анализа.

**Методы прямой гибридизации.** К методам прямой гибридизации относятся метод *Southern transfer hybridization (STH)* и метод *гибридизации in situ (In situ hybridization — ISH)*. Эти методы менее популярны в диагностике ВПЧ-инфекции в связи с тем, что они обладают низкой чувствительностью, длительностью и требуют большего количества высокоочищенной ДНК. Так, например, метод ISH выявляет ВПЧ в 72% при кондиломах и в 30% в инвазивных раковых клетках.

**Методы выявления и анализа продуктов амплификации.** Существуют дополнительные методы, расширяющие возможности ПЦР. Речь идет о выявлении и анализе продуктов амплификации. Здесь применяется несколько эффективных методов. Прежде всего, после амплификации можно исследовать состав ПЦР-продукта с помощью ферментов рестрикции (эндонуклеаз). Переваривание этих продуктов ведет к образованию ряда фрагментов, которые становятся доступными для изучения посредством гель-электрофореза.

Обычным путем исследования последовательности продуктов ПЦР является гибридизация с использованием одного или нескольких олигонуклеотидных зондов. При этом возможна идентификация типа.

Для повышения эффективности диагностического метода применяется гибридизация с помощью олигонуклеотидных зондов, которую осуществляют на панелях для микротитрования.

С целью провести одновременную гибридизацию ПЦР-продукта посредством множественных олигонуклеотидных зондов используют обратную гибридизацию. Метод заключается в иммобилизации множественных олигонуклеотидных зондов в твердой фазе и прибавлении ПЦР-продукта в жидкой фазе. После гибридизации следует стадия выявления.

Возможно также проведение методов быстрого секвенирования ПЦР-продукта. Однако метод не работает, когда образцы содержат множественные генотипы ВПЧ. Последовательности, которые составляют меньшинство в общем ПЦР-продукте, могут остаться невыявленными [51, 58].

**Другие распространенные методы.** Хорошо зарекомендовали себя широко используемые методы — иммуноферментный метод (ИФА, или ELISA — enzyme-linked



immunosorbent assay) и иммуноцитохимия. При постановке ИФА-метода антитела сорбируют на поверхности лунок планшета, а затем в лунки вносят антигенсодержащий материал. Далее проводят процедуру с добавлением специфического конъюгата с пероксидазой хрена и хромогенным субстратом. По интенсивности окрашивания пробы судят о содержании определяемого антигена. Несмотря на меньшую эффективность ИФА по сравнению с ПЦР, некоторые авторы рекомендуют использовать его для определения  $p16^{INK4a}$  [71].

Иммуноцитохимия позволяет осуществлять иммунологический анализ в условиях сохранности структуры клеток. При этом надежность метода высока, когда применяются моноклональные антитела (МАТ). В онкологической практике он занимает существенное место.

Особенно важно использование указанных методов при выявлении онкобелков Е6 и Е7, имеющих прогностическое значение (в комплексе с биомаркерами, контролирующими клеточный цикл и пролиферацию эпителия эндоцервикса), что дает возможность проследить течение ПВИ-инфекции для профилактики предопухолевого процесса и рецидивов РШМ. Известно, что вирусные онкобелки Е6 и Е7 при взаимодействии с белками  $p53$  и  $pRb$ , соответственно, нарушают нормальный ход апоптоза и вмешиваются во многие ключевые механизмы клеточной регуляции, что в конечном итоге стимулирует канцерогенез. Иммуноцитохимия также применяется при изучении биомаркеров.

**Сравнение различных методов.** При общей оценке современных молекулярно-биологических методов следует подчеркнуть, что наибольшей чувствительностью и специфичностью обладает ПЦР-метод, причем вместе с его явным преимуществом из-за небольшого количества материала в образцах для анализа. Метод  $hc2$  также чувствителен с тем отличием, что его чувствительность обеспечивается сигналом, а не амплификацией мишени. Метод Southern blot hybridization требует большего объема пробы (это затрудняет практику и не всегда доступно), в то время как гибридизация *in situ* не всегда так же чувствительна, как ПЦР и  $hc2$ .

Четвертьвековой опыт применения различных молекулярно-биологических методов при изучении урогенитальной ВПЧ-инфекции открывает возможность сравнения их эффективности, в том числе с хорошо апробированными методами прошлых лет. Такие исследования выполнены и в рамках настоящего обзора результаты одного из них целесообразно привести (табл. 2).

Из таблицы 2 видно, что самой эффективной является группа методов «Выявление геномов ВПЧ».

Затем следует группа методов «Выявление антител против ВПЧ» (наилучшие показатели имеют способы выявления Е6/Е7, хуже всего — ELISA). Первые две группы — «Основанные на клеточной морфологии» и «Выявление белков ВПЧ» — имеют ограничения из-за низкой чувствительности, сильно зависят от образцов и сохранности тканей, не определяют тип ВПЧ.

## Биомаркеры

Это — отдельная глава в структуре молекулярно-биологических методов. Она сформировалась в последние годы и вошла в число современных медицинских технологий. Применительно к обсуждаемой теме ВПЧ и онкогенеза имеется ряд обзоров и оригинальных работ [4, 9, 20, 35, 41, 45, 60, 71 и др.].

Дерегулирующая экспрессия вирусных белков онкогенов Е6 и Е7 имеет точку приложения в инфицированных базальных и парабазальных клетках шейки матки. Именно здесь обнаружены новые биомаркеры, с помощью которых идентифицируются процессы канцерогенеза на гистологическом и цитологическом уровне.

Роль биомаркеров особенно велика в диагностике предраковых состояний. Поиски в этом направлении за истекшие 25 лет открыли ряд надежных биомаркеров. К ним относятся:

- суррогатные биомаркеры, дерегулирующие онкогенную экспрессию ВПЧ ( $p16^{INK4a}$ );
- маркеры хромосомной нестабильности;
- маркеры пролиферации и репликации генома клетки-хозяина ( $ki67$ );
- маркеры клеточного стресса и инвазии;
- эпигенетические маркеры, факторы, усиливающие вирусную онкогенную активность.

**Суррогатные биомаркеры, дерегулирующие онкогенную экспрессию ВПЧ.  $p16^{INK4a}$ .** Прямым следствием дерегулирующей онкогенной активности ВПЧ является гиперэкспрессия циклин-зависимого ингибитора киназы  $p16^{INK4a}$ . В физиологическом состоянии  $p16^{INK4a}$  экспрессируется, когда клетки подвергаются геномному стрессу, например, существенному укорочению теломеров при старении. Экспрессия  $p16^{INK4a}$  в таких клетках вызывает немедленную необратимую остановку клеточного цикла и, в конце концов, приводит к апоптозу. В норме не отмечается иммуногистохимического окрашивания на  $p16^{INK4a}$  в неизменном дисплазией эпителии (применяются тест-системы типа Sintec).

Сравнение различных методов выявления ВПЧ [68]

Группы методов	Методы (тесты)	Аналитический	Клинический	
		Чувствительность / специфичность	Чувствительность/специфичность к CIN3/РШМ	
Основанные на клеточной морфологии	Пап-тест мазки/ткани	Данных не имеется	Низкая/высокая	
	Кольпоскопия	Данных не имеется	Умеренная/низкая	
	Визуальный осмотр	Данных не имеются	Низкая/низкая	
Выявление белков ВПЧ	Иммуноцитохимия/иммуногистохимия <sup>a</sup>	Низкая/высокая	Низкая/низкая	
	Электронная микроскопия <sup>a</sup>	Низкая/высокая	Низкая/низкая	
	Вестерн блот <sup>a</sup>	Низкая/высокая	Низкая/умеренная	
Выявление геномов ВПЧ	Прямые методы	Саузерн блот <sup>a, b</sup>	Умеренная/высокая	
		In situ гибридизация <sup>a, b</sup>	Умеренная/умеренная	
		Дот блот	Низкая/высокая	
	Амплификация сигнала	Гибридный захват (Hybrid capture) <sup>c, d, e</sup>	Высокая/высокая	Высокая/высокая
	Амплификация мишени	ПЦР <sup>c, d, e</sup>	Высокая/высокая	Очень высокая – высокая/высокая – умеренная
		ПЦР в реальном времени <sup>d, e</sup>	Очень высокая/высокая	Очень высокая <sup>1</sup>
Выявление антител против ВПЧ	Пептиды (ИФА)	Низкая/низкая	Низкая/низкая	
	Вариабельные липопротеины (VLP)	Умеренная/высокая	Низкая/низкая	
	Белки Е6/Е7	Высокая/умеренная	Низкая – умеренная/высокая	

Примечание: a – технически сложно и/или требует много времени; b – требует ДНК и сохранности тканей; c – меньше зависит от образца; можно выполнять в неочищенных пробах; d – подходит для высокой результативности тестирования и автоматизации; e – предоставляет информацию о вирусной нагрузке; 1 – данных не имеется

В противоположность этому патологическая экспрессия в трансформированных ВПЧ клетках ведет к диффузному окрашиванию реплицирующихся клеток в базальном и парабазальном слое. Практически все случаи РШМ, нарушения ЦИН3 (высокой степени), равно как и большинство ЦИН2, иммунопозитивны к p16<sup>INK4a</sup>. Для сравнения: при ЦИН1 только отдельные клеточные субпопуляции обнаруживают положительную иммуноцитохимическую реакцию.

Таким образом, использование иммуноцитохимического окрашивания на p16<sup>INK4a</sup> постоянно выявляет потенциально атипичные клетки на фоне нормальных, обеспечивая высокую диагностическую ценность [33]. Немаловажен также и тот факт, что гиперэкспрессия онкомаркера p16<sup>INK4a</sup> наблюдается одновременно с повышенной экспрессией вирусного онкогена E7 [39]. Имеются данные и об их метаболических связях: E7 способствует синтезу p16<sup>INK4a</sup>.

При проведении реакции на p16<sup>INK4a</sup> российские специалисты часто используют тест-системы типа «CINtek K PLUS Kit» (Германия).

**Маркеры хромосомной нестабильности.** ДНК-анэуплоидия, которая характерна для трансформированных ВПЧ повреждений даже на предраковых стадиях. Существует ряд методов для измерения содержания ДНК в отдельных клетках шейки матки (проточная цитометрия, лазерная сканирующая микроскопия и др.).

**Интеграция ВПЧ.** ДНК ВПЧ интегрируется при значительной нестабильности хромосом и продвинутых стадиях трансформационного процесса. Для определения этого используют ПЦР в режиме реального времени с целью количественной оценки соотношения генов E2 и E6/E7.

**Маркеры пролиферации и репликации генома клетки-хозяина.** Ki67. Этот белок сильно экспрессируется при нарушениях ЦИН. Но может наблюдаться

и в нормальных базальных клетках. Считается, что скопления *ki67*-положительных клеток является критерием отличия ЦИН низкой степени от нормального или реактивно измененного эпителия. Такой подход часто используется исследователями (обычно в сочетании с *p16<sup>INK4a</sup>*).

**MYC.** Данный клеточный онкоген нередко идентифицируется при РШМ. Он может быть использован при диагностике предраковых стадий.

**Циклины.** Циклины относятся к семейству регуляторных белков, контролирующих клеточный цикл. Показана гиперпродукция циклина D1 при нарушениях низкой степени, вызванных ВПЧ низкого риска, при этом отсутствуя при нарушениях, вызванных ВПЧ высокого риска.

**Теломераза.** Этот фермент также используется как биомаркер для диагностики. Его повышенную активность обнаруживали главным образом на более поздних стадиях дисплазии.

**Сложные белки репликации.** Сложные белки MCM5 и CDC6 экспрессируются в реплицирующихся, но не в покоящихся клетках. Они могут выступать в качестве диагностического инструмента. Есть доказательства и в отношении других сложных белков (MCM2 и TOP2A).

**Маркеры клеточного стресса и инвазии.** Белки теплового шока (heat shock proteins — HSPs) являются факторами, предохраняющими клеточные функции при стрессовых реакциях. При предраковых состояниях и РШМ установлена гиперпродукция HSP40, HSP60 и HSP70, связанная со степенью нарушения.

**Эпигенетические маркеры, факторы, усиливающие вирусную онкогенную активность.** Метилирование островков CpG является эпигенетическим модификатором генной экспрессии [1]. При многих видах рака гены-супрессоры опухоли инактивируются метилированием. Было найдено метилирование RASSF1 при РШМ. Продемонстрировано также, что TSLC1 как ген-супрессор опухоли инактивируется метилированием в дисплазиях высокой степени и РШМ.

Еще в число биомаркеров включают: коллаген IV типа, E-кадгерин, тимидинфосфорилазу, COX2, pAkt и др.

Резюмируя этот раздел, необходимо сказать, что наибольшее предпочтение отдается биомаркеру *p16<sup>INK4a</sup>* (после маркеров, связанных с ДНК ВПЧ; в том числе вирусных маркеров: мРНК ВПЧ или типирование отдельного ВПЧ высокого риска). Преимущество такого клеточного маркера, как *p16<sup>INK4a</sup>*, заключается в связи

с трансформационным процессом независимо от типа ВПЧ. Это позволяет проанализировать только отдельный маркер, тогда как методы, связанные с ВПЧ, всегда требуют в качестве мишени несколько онкогенных типов.

### Современные профилактические программы

Проведенный выше анализ возможностей молекулярно-биологических методов для решения задач вирусологии, онкогинекологии, онкоурологии не является самоцелью, а адресован к стратегической цели обоснования долгосрочных программ профилактики рака шейки матки. Действительно, в традиционном плане проблема как бы решена в рамках национальных и международных консенсусов, включая документы ВОЗ, профильных обществ и ассоциаций, клинические рекомендации на базе доказательной медицины и т.д. [14, 16, 37, 40].

Однако за последнее десятилетие появилась серия работ, в которых аргументированно отстаивалась точка зрения о том, что приоритет в современных скрининговых программах РШМ должен отдаваться не цитологическому методу или кольпоскопии, а молекулярно-биологическому подходу, включающему в себя оптимальный комплекс методов оценки ДНК ВПЧ и соответствующих биомаркеров [63, 64, 66, 69, 72]. Этот подход носит профилактический характер, предсказательность, высокую технологичность, экономическую эффективность и др.

Суть такого подхода заключается в следующем. Наиболее рельефно она проявляется при сравнении уже одного ведущего молекулярно-биологического метода (определения ДНК ВПЧ) с обычным цитологическим исследованием или прямой визуализации (кольпоскопия). Это демонстрируется по явным преимуществам первого перед вторым [69]:

- более высокая чувствительность (что приобретает особое значение, когда скрининг осуществляется один или два раза в жизни женщины);
- возможность при тестировании ДНК не только диагностирования заболевания, но и прогнозирования развития цервикальной дисплазии в ближайшие 3–10 лет;
- объективность оценки данных (в отличие от субъективности микроскопического анализа или кольпоскопии).

Уже в начале 2000-х годов была сделана попытка провести масштабные исследования сравнительной эффективности генетического и цитологического скрининга. Итоги четырех таких исследований объединены в таблице 3.

Таблица 3  
Сравнение результатов цитологического и ДНК ВПЧ тестирования женщин старше 30 лет [69]

Страны	Число участников	Чувствительность, %		Специфичность, %	
		Цитология	ДНК ВПЧ	Цитология	ДНК ВПЧ
Мехико [61]	6115	57	94	99	94
Коста-Рика [63]	6176	80	86	95	94
Южная Африка [44]	2925	74	84	88	82
Германия [57]	8466	98	37	95	99

Примечание: ДНК ВПЧ высокого риска определяли методом двойного генного захвата

Приведенные в таблице 3 данные свидетельствуют о том, что тестирование на ДНК ВПЧ высокого риска обнаруживает более высокую чувствительность к выявлению ЦИН 2/3 и более серьезных нарушений, чем цитологическое исследование, но при этом меньшую специфичность.

В 2003 году был опубликован мета-анализ обсуждаемой проблемы, основанный на 14 работах [67]. В нем было определено, что средняя чувствительность и специфичность генетического тестирования составляют 85 и 84%, а такие же показатели цитологического тестирования — 60 и 95%, соответственно. Следовательно, чувствительность ДНК ВПЧ тестирования на 27% выше, чем таковая цитологического тестирования, а специфичность на 8,4% меньше. Это были данные, полученные на общей женской популяции. Однако на выборке старше 30 лет чувствительность и специфичность ДНК ВПЧ увеличиваются до 89 и 90%. Сходные значения чувствительности и специфичности ДНК ВПЧ теста получены отечественными исследователями [11].

Важным фактом в аналогичных зарубежных исследованиях того времени было формулирование достоверного вывода об очень высоком отрицательном прогностическом значении, то есть, вероятности невозникновения заболевания на основании отрицательного анализа на ДНК ВПЧ, базирующейся на тестировании на ДНК высокоонкогенных ВПЧ. Было выявлено в различных популяциях и возрастных группах, что отрицательное прогностическое значение в среднем выше, чем 97% (методы ПЦР и двойного генного захвата), а в большинстве случаев — более 99% и иногда даже 100%

[38]. Выполнен еще ряд работ, в которых отрицательное прогностическое значение связывается с безопасным и экономически эффективным удлинением интервалов скрининга РШМ при ДНК ВПЧ тестировании [34, 43].

Был также затронут аспект проведения скрининга ДНК ВПЧ после лечения по поводу РШМ, особенно в связи с тем, что пролеченные женщины остаются в группе повышенного риска развития РШМ в течение 8 лет по сравнению с общей женской популяцией [69]. По традиции для ведения женщин после лечения использовались только скрининговые программы с применением цитологических исследований и кольпоскопии. Тем не менее было проведено 10 скрининговых исследований женщин после лечения с помощью ДНК ВПЧ тестирования. А.Т. Lorincz [46] обобщил результаты этих исследований и установил, что чувствительность к выявлению ЦИН 2/3, специфичность и отрицательное прогностическое значение составляют 96,5, 77,3 и 98,8%, соответственно. В группе из 123 женщин после лечения было осуществлено сравнение ДНК ВПЧ и гистологического тестирования: чувствительность при генетическом анализе — 92,7%, при цитологическом — 48,8% [56].

Естественно, при проведении сравнительных исследований сразу же не ставилась исходная задача поиска альтернативы цитологии и кольпоскопии. Новые прогрессивные методы были и будут использоваться как взаимодополняющие к классическим подходам в комплексе диагностических, лечебных и реабилитационных мер. Однако если 10 лет назад вопрос об альтернативе ДНК ВПЧ традиционному Пап-тесту, сыгравшему в последние полвека лет большую роль в профилактике и лечении РШМ, ставился предварительно, то сейчас уже существуют обширные исследования в пользу приоритета молекулярно-биологических скрининговых программ [28, 29, 50, 54, 58, 59, 62, 64, 69]. Появились и работы, которые объединяют и делают заключения по существу проблемы. Одна из них — работа М. Schiffman (2011) [64], автора многочисленных фундаментальных исследований в этой области.

Целесообразно привести его аргументацию выводов, основанных на методах доказательной медицины и имеющих стратегическое значение для современного здравоохранения:

- Новое инфицирование ВПЧ в любом возрасте всегда приобретает доброкачественный характер, однако персистирующая инфекция одним из примерно 12 онкогенных типов ВПЧ фактически объясняет все случаи рака шейки матки. В отсутствие явно перси-

стирующей ВПЧ-инфекции риск развития РШМ чрезвычайно мал.

- Результаты ВПЧ-тестирования предсказывают риск развития РШМ или его предшествующих стадий (цервикальная интраэпителиальная неоплазия 3-й степени) лучше и долгосрочнее, чем цитологические или кольпоскопические отклонения, которые являются симптомами ВПЧ-инфекции.

- Логичное и неизбежное следование превентивной стратегии ВПЧ-индуцированного генеза РШМ требует более длительных интервалов скрининга, что изменит практику гинекологов и цитологических лабораторий, построенную на частом скрининге.

- Главным вызовом станет реализация программ, которые не будут заниматься избыточным лечением ВПЧ-позитивных женщин, не имеющих очевидных признаков длительной персистенции ВПЧ или поддающихся излечению нарушений в момент первоначальной оценки.

- Наибольшим потенциалом для снижения роста заболеваемости РШМ путем ВПЧ-скрининга обладают развивающиеся страны, которые могут осуществить нечастые циклы недорогого ВПЧ-тестирования и лечения.

Особенно следует подчеркнуть последний тезис о развертывании предлагаемых новых программ. Если в развитых странах речь пойдет о постепенной адаптации и модификации существующих скрининговых программ, то в развивающихся странах должно быть принято решение о неповторении пути развитых: сразу же приступить не к цитологическим, а к молекулярно-биологическим программам.

Таким образом, становится очевидной необратимая тенденция к внедрению высоких технологий в клиническую практику ведения больных с социально значимой патологией, к которой относится и рак шейки матки. Это — утилитарная, практическая цель. Но есть и другая, не менее важная: разработка преемственных программ первичной и вторичной профилактики с включением в них новых перспективных терапевтических средств, например, вакцин, мишенями которых являются генотипы.

### **Заключение**

Проведенный обзор демонстрирует качественно новый уровень концептуальных представлений о казалось бы довольно хорошо исследованной нозологии, которой является рак шейки матки. Весь ход развития теории, методологии и практики изучения данного заболевания свидетельствует, что специалисты XXI века должны

работать в рамках триады «онкология — гинекология — андрология». Современная онкология урогенитальной сферы требует мультидисциплинарного подхода в отношении диагностики, лечения, проведения реабилитационных и профилактических программ, составлении обоснованного прогноза [5, 6, 10]. При этом возрастает роль смежных наук и новых направлений — вирусологии, иммунологии, генетики, трансплантологии, клеточных технологий, биоинформатики и т.д. Значимость этого подчеркивалась на недавно прошедшей в мае 2014 года в МНИОИ им П.А. Герцена конференции «Молекулярно-генетические маркеры в диагностике и лечении онкоурологических заболеваний».

Достижения молекулярной биологии в целом выдвигают на первый план так называемую медицину будущего (P4). Действительно, медицина P4, доктрина которой создана в начале нынешнего столетия [3, 23], включает в себя четыре механизма:

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

Весь комплекс этих механизмов проникнут идеей использования высоких технологий, центром которой является индивидуум с его уникальным биологическим, генетическим, иммунным и иным паспортом. При этом исповедуется принцип в лечении: не одно средство для всех, а все — для одного. То есть реализуется на новом витке знаний классическая схема об индивидуальной вариативности, индивидуальном подходе.

Предсказательный аспект медицины P4 включает в себя вероятностный прогноз здоровья (на основании ДНК-последовательности), многопараметрическую оценку ключевых биохимических показателей в динамике и др. Идея профилактики реализуется стратегией упреждения действия рисков посредством системного подхода.

Выдвигаемая профильными специалистами (в основном зарубежными) в онкогинекологии и других направлениях, курирующих больных РШМ, концепция включения молекулярно-биологической методологии в скрининговые профилактические программы вполне отвечает современным тенденциям, в том числе и медицине P4. Конечно, как и все новое, это потребует переходного периода, который может носить эволюционный характер и в течение которого будут модифицированы или кардинально перестроены стандарты диагностики и лечения, составлены образовательные программы и клинические рекомендации, подготовлены новые кадры и т.д.

## Литература

1. Акишев А.Г., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Эпигенетическое типирование малигнанных клеточных линий человека с помощью анализа B1sI и Glal-ПЦР-анализа // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2011. — Т. 7. — № 3. — С. 5–16.
2. Акопова Е.С. Совершенствование лечебно-диагностических подходов к ВПЧ-инфекции гениталий: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 2011. — 23 с.
3. Васильев Р.Г. Биотехнология для медицины XXI века / В сб.: Материалы VII Международной конференции по реабилитологии. Москва, 27–28 октября 2011 г. — М., 2012. — С. 29–37.
4. Волгарева Г.М. и др. Гиперэкспрессия клеточного белка p16<sup>INK4a</sup> в эпителиальных злокачественных опухолях, индуцированная вирусами папилломы человека // Арх. патол. — 2008. — № 5. — С. 57–60.
5. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. (ред.). Злокачественные новообразования в России в 2012 г. (заболеваемость и смертность). — М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2014. — 250 с.
6. Каприн А.Д., Филимонов В.Б., Васин Р.В., Костин А.А., Васина И.В. Полипропиленовые имплантаты в урологии // Андрология и генитальная хирургия. — 2011. — № 4. — С. 43–49.
7. Киселев В.И. Вирусы папилломы человека в развитии рака шейки матки. — М.: Димитрейд График Групп, 2004. — 184 с.
8. Киселев В.И., Муйжнек Е.Л. Молекулярные механизмы развития дисплазии шейки матки: новые знания — новые возможности // Вестник лаборатории ДНК-диагностики. — 2011. — № 4(13). — С. 1–16.
9. Короленкова Л.И. Клинические и молекулярно-генетические основы предрака и ранних форм рака шейки матки: автореф. дис. ... доктора мед. наук. — Рос. онкол. научн. центр им. Н.Н. Блохина РАМН, 2014. — 52 с.
10. Костин А.А., Каприн А.Д. Возможности современной эндouroлогии в паллиативной помощи онкологическим больным // Вопр. онкологии. — 2006. — Т. 52. — № 5. — С. 670–672.
11. Куевда Д.А. Комплекс молекулярно-биологических методов для скрининга рака шейки матки: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Военно-мед. акад. им. С.М. Кирова, 2013. — 26 с.
12. Кушлинский Н.Е., Немцова М.В. Молекулярно-биологические характеристики злокачественных новообразований // Вестник РАМН. — 2014. — № 1–2. — С. 5–15.
13. Минкина Г.Н. Папилломавирусная инфекция человека: ситуация и перспективы специальной профилактики // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2007. — № 4. — С. 37–40.
14. Новик В.И. Скрининг рака шейки матки // Практик. онкология. — 2010. — Т. 11. — № 2. — С. 66–73.
15. Папилломавирус человека: Википедия <http://ru.wikipedia.org>.
16. Патология шейки матки и генитальные инфекции / Под ред. В.Н. Прилепской. — М.: МЕДпресс-информ, 2008. — 384 с.
17. Профилактика рака шейки матки: Руководство для врачей / Под ред. акад. РАМН Г.Т. Сухих, проф. В.Н. Прилепской. 3-е изд., перераб. и доп. — М.: МЕДпресс-информ, 2012. — 192 с.
18. Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки: руководство для практикующего врача. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. — 144 с.
19. Самосудова И.Б. Совершенствование лечебно-диагностических подходов при цервикальном предраке, ассоциированном с папилломавирусной инфекцией: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Омск. гос. мед. акад., 2012. — 24 с.
20. Сабдулаева Э.Х. Клиническое значение биомаркеров при папилломавирусной инфекции: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 2013. — 23 с.
21. Трушина О.И., Завалишина Л.Э., Новикова Е.Г., Андреева Ю.Ю., Франк Г.А. Детекция ДНК вируса папилломы человека при фотодинамической терапии предрака и начального рака шейки матки // Российский онкологический журнал. — 2007. — № 2. — С. 24–26.
22. Трушина О.И., Новикова Е.Г. Роль папилломавирусной инфекции в генезе шейки матки // Российский онкологический журнал — 2005. — № 1. — С. 45–51.
23. Худ Лерой. От системной биологии к медицине P4 (Predictive, Personalized, Preventive, Participatory) // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2010. — Т. 6. — № 2. — С. 54–57.
24. Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Вахитов В.А. Как исключить появление ложно-положительной реакции при проведении полимеразной цепной реакции // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2012. — Т. 8. — № 3. — С. 34–45.
25. Abreu A.L.P. et al. A review of methods for detect human Papilloma virus infection // Virology J. — 2012. — Vol. 9. — P. 262. <http://www.virologyj.com/content/9/1/262>.
26. Bosch F.X., Qiao Y.-L., Castella X. Chapter 2. The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer // Int. J. Gynecol. Obstet. — 2006. — Vol. 94 (Suppl. 1). — S8–S21.
27. Brink A.A.T.P., Snijders P.J.F., and Meijer Ch.J.L.M. HPV detection methods // Disease Markers. — 2007. — Vol. 23. — P. 273–281.

28. *Bulk S. et al.* Risk of high-grade cervical intra-epithelial neoplasia based on cytology and high-risk HPV testing at baseline and at 6-months // *Int. J. Cancer.* – 2007. – Vol. 121(2). – P. 361–367.
29. *Bulkmans N.W. et al.* Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer 5-years follow-up of a randomized controlled implementation trial // *Lancet.* – 2007. – Vol. 370(9601). – P. 1764–1772.
30. *Burd E.M.* Human papillomavirus and cervical cancer // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2003. – Vol. 16(1). – P. 1–17. DOI: 10.1128/CMR.16.1.1-7.2003.
31. *Chan P.K.S. et al.* Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing // *Critical Reviews in Clinical Reviews.* Informa Healthcare. – 2012. – Vol. 49(4). – P. 117–136.
32. *Clavel C., Masure M., Putaud I. et al.* Hybrid capture II, a new sensitive test for human papillomavirus detection. Comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions // *J. Clin. Pathol.* – 1998. – Vol. 51. – P. 737–740.
33. *Denton K.J. et al.* The sensitivity and specificity of p16INR4a cytology vs HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASCUS and LSIL Pap cytology results // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2010. – Vol. 134(1). – P. 12–21.
34. *Dillner J. et al.* Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study // *BMJ.* – 2008. – Vol. 337. – a1754.
35. *Doorbar J.* Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection // *Disease Markers.* – 2007. – Vol. 23(4). – P. 297–313.
36. *Dulbecco R.* Nobel Lecture: From the Molecular Biology of Oncogenic DNA Viruses to Cancer. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1975/dulbecco-lecture.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1975/dulbecco-lecture.html).
37. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. II Edition. International Agency for Research on Cancer. – 2008.
38. *Franco E.L.* Primary screening of cervical cancer with human papillomavirus test // *J. Natl. Cancer Inst. Monog.* – 2003. – Vol. 31. – P. 89–96.
39. *Gu M. et al.* The predictive value of p16<sup>INK4a</sup> and hybrid capture 2 HPV testing for high-grade cervical intraepithelial neoplasia // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2004. – Vol. 122. – P. 894–901.
40. Human papillomavirus laboratory manual – World Health Organization. [http://www.who.int/immunization/hpv/learn/hpv\\_laboratory\\_manual\\_\\_who\\_ivb\\_2009\\_2010.pdf](http://www.who.int/immunization/hpv/learn/hpv_laboratory_manual__who_ivb_2009_2010.pdf).
41. *Hwang S.J., Shroyer K.R.* Biomarkers of cervical dysplasia and carcinoma // *J. Oncol.* – 2012. 507286. Epub 2011 Oct 29.
42. *Johnson L.R. et al.* A comparison of two methods to determine the presence of high-risk HPV cervical infections // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2008. – Vol. 130. – P. 401–408.
43. *Khan M.J. et al.* The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2005. – Vol. 97(14). – P. 1072–1079.
44. *Kuhn L. et al.* Human papillomavirus DNA testing for cervical cancer screening in low-resource setting // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2000. – Vol. 92. – P. 818–825.
45. *Litjens R.J.N.T.M. et al.* Molecular biomarkers in cervical cancer diagnosis: a critical appraisal // *Expert Opinion on Medical Diagnostics.* Informa Healthcare. – 2013. – Vol. 7(4). – P. 365–377.
46. *Lorincz A.T.* Screening for cervical cancer: new alternatives and research // *Salud Publica Mex.* – 2003. – Vol. 45 (Suppl. 3). – S376–387.
47. *Lorincz A.T., Richart R.M.* Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2003. – Vol. 127. – P. 959–968.
48. *Lowy D.R. et al.* Human papillomavirus infection and the primary and secondary prevention of cervical cancer // *Cancer.* – 2008. – Vol. 113. – P. 1980–1983. Doi 10.1002/cncr.23704.
49. *Malik A.I.* The role of human papilloma virus (HPV) in the aetiology of cervical cancer // *J. Pak. Med. Assoc.* – 2005. – Vol. 55. – No. 12. – P. 553–558.
50. *Mayrand M.H., Duarte-Franco E., Rodrigues I. et al.* HPV DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer // *N. Engl. J. Med.* – 2007. – Vol. 357. – P. 1579–1588.
51. *Molijn A. et al.* Molecular diagnostics of human papillomavirus (HPV) infection // *J. Clin. Virol.* – 2005. – Vol. 32(Suppl.). – S43–S51.
52. *Munoz N., Bosch X. et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer // *New England J. Med.* – 2003. – Vol. 348. – P. 518–527.
53. *Munoz N., Castellsague X. et al.* Chapter 1. HPV in etiology of human cancer // *Vaccine.* – 2006. – Vol. 24(Suppl. 3). – S3/1–S3/10.
54. *Naucler P. et al.* Human papillomavirus and Papanicolaou tests for cervical cancer // *N. Engl. J. Med.* – 2007. – Vol. 357(16). – P. 1589–1597.
55. *Pagliasi S.R., and Garland S.M.* International standard reagents for HPV detection // *Disease Markers.* – 2007. – Vol. 23. – P. 283–296.
56. *Paraskevaidis E. et al.* Human papillomavirus testing and the outcome of treatment for cervical intraepithelial neoplasia // *Obstet. Gynecol.* – 2001. – Vol. 98. – P. 833–866.
57. *Petri K.U. et al.* Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany:

- results for 8468 patients // *Br. J. Cancer.* — 2003. — Vol. 88. — P. 1570–1577.
58. *Piana A. et al.* Molecular methods for the detection of human papillomavirus infection: new insights into their role in diagnostics and epidemiological surveillance // *Italian J. of Public Health.* — 2009. — Vol. 6. — No. 2. — P. 164–171.
59. *Ronco G. et al.* Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. — 2010. — *Lancet Oncol.* — 2010. — Vol. 11(3). — P. 249–257.
60. *Sahasrabudde V.V., Luhn P., and Wentzensen N.* Human papillomavirus and cervical cancer: biomarkers for improved prevention efforts // *Future Microbiol.* — 2011. — Vol. 6(9). — 10.2217/fmb.11.87. doi 10.2217/fmb.11.87.
61. *Salmeron J., Lazcano-Ponce E., Lorincz A., et al.* Comparison of HPV-based assays with Papanicolaou smears for cervical cancer screening in Morelos State Mexico // *Cancer Causes Control.* — 2003. — Vol. 14(6). — P. 505–512.
62. *Sankaranarayanan R. et al.* HPV screening for cervical cancer in rural India // *N. Engl. J. Med.* — 2009. — Vol. 360(14). — P. 1385–1394.
63. *Schiffman M. et al.* HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from a high-risk province in Costa Rica // *JAMA.* — 2000. — Vol. 283. — P. 87–93.
64. *Schiffman M. et al.* Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer // *J. Natl. Cancer Inst.* — 2011. — Vol. 103(5). — P. 368–383.
65. *Schiffman M. et al.* The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution // *Virology.* — 2005. — Vol. 337. — P. 731–738.
66. *Schiffman M., Castle P.E.* The promise of global cervical cancer prevention // *N. Engl. J. Med.* — 2005. — Vol. 353. — P. 2101–2104.
67. *Sherman M.E. et al.* Baseline cytology human papillomavirus testing and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis // *J. Natl. Cancer Inst.* — 2003. — Vol. 95. — P. 46–52.
68. *Villa L.L.* Laboratory methods for detection of human papillomavirus infection / In: A. Rosenblatt, H.G. de Campos Guidi. *Human Papillomaviruses. A Practical Guide for Urologists.* Chapter 2. — Springer, 2009. — P. 23–30.
69. *Villa L.L., Denny L.* Methods for detection of HPV infection and its clinical utility // *Int. J. Gyn. Obst.* — 2006. — Vol. 94. — Suppl. 1. — S71–S80.
70. *Wentzensen N.* Molekulare Diagnostik der HPV-Infektion // *Der Pathologie.* — 2011. — Vol. 32(6). — P. 461–466.
71. *Wentzensen N., von Knebel Doeberitz M.* Biomarkers in cervical cancer screening // *Disease Markers.* — 2007. — Vol. 23(4). — P. 315–330.
72. *Zaravinos A., Mamas I.M., Sourvinos G., Spandios D.A.* Molecular detection methods of human papillomaviruses (HPV) // *Int. J. Biol. Markers.* — 2009. — Vol. 24. — No. 4. — P. 215–222.
73. *Zur Hausen H.* Condylomata acuminata and human genital cancer // *Cancer Res.* — 1976. — Vol. 36. — P. 794.
74. *Zur Hausen H.* Nobel lecture. — 2008. [www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org).

#### Список сокращений

ВПЧ — вирус папилломы человека,  
ИППП — инфекции, передаваемые половым путем,  
ИФА — иммуноферментный анализ; см. *ELISA*,  
МАТ — моноклональные антитела,  
ПАП-тест — мазок Папаниколау,  
ПВИ — папилломавирусная инфекция,  
ПЦР — полимеразная цепная реакция,  
РШМ — рак шейки матки,  
ЦИН — цервикальная интраэпителиальная неоплазия,  
*ELISA* — enzyme-linked immunosorbent assay; см. *ИФА*.

## MOLECULAR BIOLOGICAL BASIS OF ETIOPATHOGENESIS AND DIAGNOSTICS OF HUMAN PAPILLOMA VIRUS INFECTION: SIGNIFICANCE FOR REALISATION OF PROGRAMS TO PREVENT CERVICAL CANCER

A.T. ASRATOV<sup>1,2</sup>, A.A. KOSTIN<sup>1,2</sup>, O.I. TRUSHINA<sup>1</sup>, A.D. KAPRIN<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *P.A. Herzen Moscow Research Oncological Institute, Russian Ministry of Health,*

<sup>2</sup> *Peoples' Friendship University of Russia, Moscow*

We review the current data on the etiopathogenesis and molecular diagnostics of HPV infection in connection with the implementation of programs to prevent cervical cancer. Emphasis on recently appeared evidence base that justifies the benefits of HPV DNA testing over conventional cytological screening and visual studies was placed.

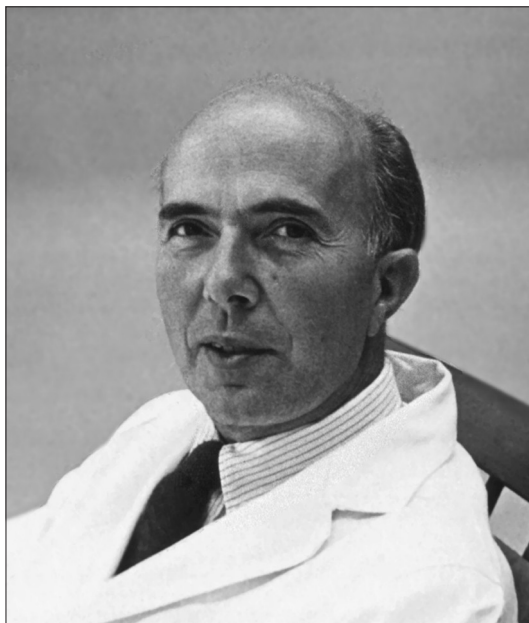
*Keywords:* human papillomavirus, cervical cancer, etiopathogenesis, molecular diagnostics, screening programs.



## К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ РЕНАТО ДУЛЬБЕККО – ВЫДАЮЩЕГОСЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО БИОЛОГА XX СТОЛЕТИЯ

В.С. ВОРОБЬЕВ\*

*Общество биотехнологов России имени Ю.А. Овчинникова, Москва*



В 2014 году исполняется 100 лет со дня рождения Ренато Дульбекко, итало-американского вирусолога, внесшего существенный вклад в развитие молекулярной биологии. Он принадлежит к блестящей плеяде итальянских ученых, в ее числе Сальвадор Луриа и Рита Леви-Монтальчини, учившихся в одной *alma mater* — Туринском университете, в силу жизненных обстоятельств всех троих эмигрировавших в США и добившихся высокого признания, все, правда порознь, став Нобелевскими лауреатами.

*Биография и научный вклад.* Ренато Дульбекко родился 22 февраля 1914 года в итальянской провинции Катандзаро (Калабрия), на родине его матери Марии Вирдии (Дульбекко). Вскоре после рождения его отец Леонардо Дульбекко (он — по происхождению лигури-

анец) был призван в армию, так как разразилась Первая мировая война. Ренато вместе с матерью, братьями и сестрами всю войну провели на севере Италии, неподалеку от Турина. После войны вся семья поселилась на родине отца, в Лигурии.

В 1930 году он поступил в Туринский университет, где изучал медицину (не без влияния дяди-хирурга). Его больше интересовала биология, и он стал работать в лаборатории Джузеппе Леви, профессора анатомии. Здесь он познакомился с молодыми исследователями С. Луриа и Р. Леви-Монтальчини, с которыми у него завязалась творческая и человеческая дружба на долгие годы. Ренато был очень талантлив, учился лучше всех своих сверстников, овладевал тонкостями гистологии и особенно культуры тканей (еще в юности у него были привязанности к занятиям физикой и математикой).

По окончании в 1936 году университета он был призван офицером на службу в армию. В 1938 году демобилизовался и продолжил работу в области патологии в Турине. Однако в связи с началом Второй мировой войны в 1939 году был вновь призван в армию. Сначала служил в итальянских войсках на французском фронте, а затем воевал против СССР, где был ранен в 1942 году на Донском фронте. После ранения находился в госпитале и дома. Когда пало правительство Муссолини и Италия была оккупирована Германией, Дульбекко присоединился к итальянскому движению сопротивления (выполнял обязанности врача партизанских отрядов).

В послевоенные годы он возобновил работу в Анатомическом институте в Турине. При этом занялся политической деятельностью, вступив в Комитет национального освобождения города Турина и став членом первого послевоенного муниципального совета, но вскоре оставил это поприще и целиком посвятил себя науке, вернувшись в Институт Леви и начав совместные работы с Леви-Монтальчини. Вскоре в 1946 году здесь произошла судьбоносная для него встреча с Сальвадором Луриа, который прибыл в летний отпуск на родину из США, куда он эмигрировал в 1940 г. [1]. Луриа при-

© 2014 г. Воробьев В.С.

\* **Автор для переписки:**

Воробьев Вадим Сергеевич

к.м.н., член Центрального Правления

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

E-mail: obr@biorosinfo.ru

гласил Ренато Дульбекко работать в его группе в Индианском университете (г. Блумингтон) и обеспечил ему небольшую зарплату. В 1947 году перебралась в США и Рита Леви-Монтальчини (в другую лабораторию). Так все три воспитанника итальянского профессора Леви оказались на далеком американском континенте, где их впоследствии ждала большая слава.

В Блумингтоне Дульбекко занялся фаговой тематикой совместно с Лурия в небольшой лаборатории, куда вскоре поступил также аспирантом Джеймс Уотсон, будущий первооткрыватель двойной спирали ДНК. Здесь Дульбекко выполнил ряд исследований и опубликовал их результаты, применив свои знания математики к изучаемой проблеме и открыв фотореактивацию фага, инактивированного ультрафиолетовым светом [10, 16, 20, 32]. Эти статьи были замечены Максом Дельбрюком [2], к тому же состоялось их личное знакомство на летнем семинаре в Колд-Спринг Харборе, и тот не замедлил пригласить столь успешного дебютанта к себе в Калифорнийский технологический институт (сокращенно — «Калтех») в Пасадене, где Дульбекко было предоставлено место старшего научного сотрудника. По-видимому, сказалось и то, что в статьях Дульбекко прослеживалась тенденция к использованию математического аппарата (это явно импонировало физику Дельбрюку). Надо сказать, что у Дельбрюка было чутье на таланты, и он сумел в условиях эмиграции в США в 1940–1950-е годы объединить специалистов вокруг идеи формирования молекулярной биологии [2].

В 1949 году Дульбекко переехал в Калифорнию. Путешествие с востока на запад США он совершил на своем старом автомобиле с семьей (он женился в 1940 году на Джозефине Сальва, у них родились сын и дочь). На итальянца произвели сильное впечатление огромная территория этой страны и ее народ.

В Калтехе им в течение нескольких лет были продолжены исследования бактериофагов. Однако затем Дельбрюк предложил ему заняться изучением вирусов животных на выделенный грант. Разработанные совместно с Лурия и Дельбрюком количественные методы были применены Дульбекко к исследованию вирусов полиомиелита и саркомы Рауса и уже через год занятий этим был разработан соответствующий метод.

Важным моментом в творческой жизни Дульбекко стал контакт с Маргарет Фохт, дочерью известных германских неврологов Оскара и Сесиль Фохтов [33]. Она прибыла в Калтех из Германии в 1950 году также по приглашению Макса Дельбрюка, имея опыт работы с дрозофилой. Ее методическое мастерство в области

культуры тканей позволило двум эмигрантам быстро решить вопрос о культивировании вируса полиомиелита. Вскоре в 1954 г. появилась их эпохальная статья об изучении вирусных бляшек, что позволило количественно исследовать вирусы [26]. Начиная с этого времени, много внимания уделялось созданию культуральных сред, что привело к получению удачных модификаций, сохранившихся до сих пор. Речь идет о специальных культуральных средах, наименованных в его честь «средами Дульбекко», которые и сейчас являются популярными в профессиональном сообществе клеточных биологов (что в немалой степени способствовало увековечению его необычной, звучной фамилии). Это — модифицированная среда Игла (Dulbecco's Modified Eagle's Minimal Essential Medium — DMEM) и фосфатнобуферная система (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline — DPBS).

В это же время происходил и карьерный рост Дульбекко: в 1952 году он стал адъюнкт-профессором, а в 1954 г. — полным профессором.

Вирусологическое направление усиленно разрабатывалось Дульбекко. Вскоре в конце 1950-х годов в его лаборатории появились студент-старшекурсник, в будущем знаменитость Ховард Темин [3], открывший обратную транскриптазу, и постдокторант Гарри Рубин, которые занимались исследованием саркомы Рауса. Их тематика вызвала интерес со стороны Дульбекко. Начиная с 1958 года, он стал изучать онкогенный вирус — вирус полиомы, вызывающий множественные опухоли у мыши. Эта работа в конечном итоге привела его ко многим кардинальным находкам в данной области, которые создали ему широкую известность в научном мире.

Прежде всего, речь идет об его открытии (вместе с коллегами) принципиального факта, что клетки опухоли трансформируются под влиянием онкогенных вирусов и начинают неограниченно делиться (данный процесс назван им «клеточной трансформацией»). Дульбекко были открыты процессы онкотрансформации в некоторых культурах клеток полиомы, которые он назвал «пермиссивными» (то есть «разрешительными»), в отличие от непермиссивных культур, в которых клетки полиомы не растут.

Сразу же об этом открытом феномене было сообщено в научной печати [21, 22, 24, 36]. Факты о молекулярных событиях, связанных с трансформацией, стали накапливаться и подтверждаться другими исследователями. Позднее Дульбекко распространил свои работы и на обезьяний вирус SV 40, вызывающий лейкоз у этих животных.

В целом Дульбекко удалось решить главный вопрос о том, что генетический материал вируса встраивается в геном трансформированных клеток, которые при этом получали новые генетически детерминированные характеристики от внедренного вируса. Речь идет о возможности наличия генетической информации для синтеза около семи белков, часть из которых (как было продемонстрировано позднее) обладает онкогенным действием. Надо подчеркнуть, что Дульбекко показал этот механизм вирусного встраивания в геном чужеродной клетки на примере ДНК-вирусов, а вот его ученик Темин сумел в острых дискуссиях доказать возможность переноса генетической информации от РНК-вирусов к инфицированным ими клеткам. Темину удалось выявить существование в РНК-вирусах специального фермента — обратной транскриптазы, или ревертазы (впоследствии названной РНК-зависимой ДНК-полимеразой). Данный фермент позволял делать ДНК-копии с РНК, что вначале, по мнению ученых, противоречило центральной догме молекулярной биологии: «ДНК — РНК — белок» [11, 18].

В 1962 году Дульбекко переехал в Солковский институт биологических исследований, где ему предоставили место старшего научного сотрудника. Этот институт расположен также в Калифорнии в городе Ла Жолла. Здесь он возглавил группу исследователей, занимавшихся проблемой канцерогенеза. В его трудах с этих пор стала помогать вторая жена Маурина Мьюир (с первой женой он развелся, от второго брака родилась дочь Фиона). Ученый всегда подчеркивал ее роль в этом этапе своих исследований.

В Институте Солка Дульбекко находился до 1972 года, после чего он был приглашен в Великобританию на должность заместителя директора Лабораторий Имперского фонда по изучению рака (Imperial Cancer Research Fund Laboratories) в Лондоне, где занимался онкогенезом у человека, используя свои экспериментальные наработки на животных.

В 1975 году произошло знаменательное событие в его жизни: присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине за исследование механизма действия онкогенных вирусов (рис. 1). Дольщиками по премии были Д. Балтимор и Х. Темин, получившие ее за открытие обратной транскриптазы, причем Темин, как уже указывалось, был его учеником.

Общая формулировка Нобелевского комитета звучала так: «за открытия, касающиеся взаимодействия между вирусами опухолей и генетическим материалом опухолей». Завершался круг молекулярно-генетической гонки XX века, оставалось лишь добавить некоторые де-

тали: ускоренное секвенирование, расширение практики генной инженерии, ПЦР и т.д. Дальше следовало вхождение в геномную и постгеномную эру. И имя Дульбекко тоже было записано в этой славной истории.



Рис. 1. Вручение Нобелевской премии Р. Дульбекко

В Нобелевской речи, помимо краткого изложения обстоятельств и сути своего открытия, ученый в заключение останавливается на этическом аспекте. В частности, он указал на то, что «в последние годы разрыв между наукой и обществом стал чрезмерным и последствия этого особенно остро ощущаются биологами. Так что, пока мы тратим все свои силы в поисках ответа на вопросы о природе рака и путях его профилактики или лечения, общество беззаботно производит канцерогенные вещества и заражает ими окружающую среду» [15].

После получения Нобелевской премии исследовательские интересы Дульбекко переместились в сферу изучения естественно протекающего рака. Он сосредоточился на модельной системе канцерогенеза — молочной железе крыс. При этом акцент был сделан на исследование развития молочной железы в норме с помощью моноклональных антител. Естественно, что перед 60-летним ученым открылось огромное исследовательское поле, где вопросов всегда больше, чем ответов. При объективной оценке следует отметить, что эта серия работ известного ученого уступает его начальному «звездному» циклу по вирусному канцерогенезу. Великие истины нечасто открываются одному и тому же человеку в течение жизни (за редкими исключениями). Однако в порядке компенсации Дульбекко было суждено создать в своей лаборатории благоприятную обстановку для воспитания научной смены (об этом говорили многие его ученики).

В 1977 году Дульбекко вернулся из Англии в Солковский институт, где позднее, с 1988 по 1992 гг. был его президентом. В середине 1980-х годов он стал одним из активных инициаторов реализации суперпроекта «Геном человека». Особенно памятна специалистам его статья на эту тему в «Science» в 1986 году, которая сначала вызвала резкую критику, а затем получила поддержку [8].

В 1992 году родина вспомнила своего незаурядного сына и Итальянский Национальный исследовательский совет попросил Дульбекко организовать Итальянский геномный проект. Его реализация дала некоторые результаты, однако через пять лет он прекратил свое существование из-за разрозненности исполнителей и недостатка оборудования и финансирования.

В эти же 1990-е годы Дульбекко вступил во взаимодействие с Национальным исследовательским советом и Национальным институтом рака в Милане. Тематика совместных работ была посвящена исследованию молочной железы в контексте канцерогенеза с целью оценки влияния генов и роли стволовых клеток.

Трудился он до 2006 года как в Институте Солка, так и в контакте с соотечественниками. Скончался ученый 19 февраля 2012 года в городе Ла Джолла, не дожив 3 дней до 98 лет.

Таков жизненный итог знаменитого вирусолога и генетика.

Дульбекко в период расцвета своей карьеры пользовался большим авторитетом в профессиональной среде. Его отличали такт, доброжелательность, уважительное отношение к коллегам. Об этом очень хорошо свидетельствует его высказывание в автобиографии: «На мою работу на протяжении многих лет сильно влияли мои товарищи. Джузеппе Леви учил меня ценить критицизм в научной деятельности; Рита Леви-Монтальчини помогла мне определить свои цели на начальных стадиях; Сальвадор Луриа ввел меня в мир вирусов; Герман Меллер в Индианском университете приучил меня признавать значение генетики; Макс Дельбрюк помог мне понять научный метод и цели биологии, а Маргарет Фохт научила меня понимать культуру клеток животных. Возможно, более важно, чем все это, было ежедневное общение в течение долгих лет с непрерывно меняющейся группой молодых исследователей, формировавшее мою работу. Хотя я имел общие цели, действительный путь, по которому я следовал в своих исследованиях, неизменно определялся тем, что реально можно было сделать в данный момент, и молодые сотрудники были главной составляющей этого процесса. Я всегда, насколько это было возможно,

делал экспериментальную работу своими руками, но на поздних этапах моей исследовательской карьеры это постепенно становилось все менее осуществимым из-за отсутствия времени и повышения утонченности и технической сложности экспериментов, требующих большого числа специальных навыков» [34].

Сходные мысли высказывали многие выдающиеся исследователи, но в устах Дульбекко открывается глубина признания всех без исключения участников научного процесса: учителей, товарищей, учеников. Больше того, такой метод корпоративной гармонии практиковался рядом крупных ученых — Бор, Дельбрюк, Йерне и др. (наряду с более распространенными подходами типа «абсолютного культа руководителя» — немецкие научные школы — или «просвещенной монархии» — биохимическая школа В.А. Энгельгардта). Хорошо известен факт, когда Бор на вопрос, почему у него так много учеников, ответил: «Я никогда не стеснялся заявить своим ученикам, что я глупее их».

Подтверждение фактов уникальных педагогических способностей Дульбекко можно найти в воспоминаниях ученых, стажировавшихся у него. Так, например, В. Эхарт в некрологе подчеркивает, что Дульбекко создал в своей лаборатории обстановку научного братства: все были сплочены единой целью, общение было наполнено тонким юмором [28]. Дольщик по Нобелевской премии Д. Балтимор в памятном слове о нем также находит теплые слова и именует его «мягким суперменом» [6]. Но лучшим доказательством эффективности педагогической парадигмы Дульбекко являются четыре Нобелевских лауреата, проходившие подготовку у него в Институте Солка (Тонегава С., Хартвел Л., Берг П., Балтимор Д.).

*Награды.* Исследователь такого уровня, как Дульбекко, безусловно, был удостоен множества наград. Он был избран иностранным членом Лондонского Королевского общества и Итальянской национальной академии наук, почетным доктором ряда университетов. Его наградили премией Альберта Ласкера за фундаментальные медицинские исследования (1964), премией Э. Ваксмана по микробиологии Национальной академии наук США (1974) и др.

*Публикации.* Все ключевые работы Ренато Дульбекко опубликованы в ведущих мировых журналах (в Докладах Национальной академии наук США, материалах симпозиумов в Колд-Спринг Харборе, в журналах «Science», «Genetics»), включая профильные в области вирусологии, иммунологии, молекулярной биологии и др. Существуют многочисленные источники со ссылками на его работы. Ключевые публикации

Дульбекко приведены в его Нобелевской лекции [15] и в других источниках [29–31]. Он является автором ряда книг и руководств на английском [7, 9, 19, 23] и итальянском [12–14, 17, 25] языках. Имеются автобиография ученого [34] и отдельные биографические материалы [4, 5, 27, 35].

## Литература

1. 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.
2. Воробьев В.С. Макс Дельбрюк — путь от физики к биологии: к 100-летию со дня рождения и 25-летию со дня смерти // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2006. — Т. 3. — № 3. — С. 68–77.
3. Воробьев В.С., Воробьева О.В. К 75-летию со дня рождения Х. Темина — исследователя, открывшего обратную транскрипцию // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2009. — Т. 5. — № 1. — С. 63–66.
4. Лауреаты Нобелевской премии: Энциклопедия / Пер. с англ. В 2-х т. — М.: Прогресс. — Т. 1. — С. 426–429.
5. Марьянович А.Т., Князькин И.В. Взрыв и цветение. Нобелевские лекции по медицине 1901–2002. — СПб.: Изд-во ДЕАН, 2003. — С. 124–131.
6. Baltimore D. Retrospective: Renato Dulbecco (1914–2012) // Science. — 2012. — Vol. 335(6076). — P. 1587.
7. Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N., Ginsberg H.S. Microbiology. 3<sup>rd</sup> ed. — Hagerstown, Maryland. Harper & Rows Publishers, 1980. — 1355 p.
8. Dulbecco R. A turning point in cancer research: Sequencing the human genome // Science. — 1986. — Vol. 231(4742). — P. 1055–1056.
9. Dulbecco R. Encyclopedia of Human Biology. Vol. 6. — Acad. Press, 1997.
10. Dulbecco R. Experiments on photoactivation of bacteriophage inactivated with ultraviolet radiation // J. Bact. — 1950. — Vol. 59. — P. 329–347.
11. Dulbecco R. From the molecular biology of oncogenic DNA viruses to cancer // Science. — 1976. — Vol. 192(4238). — P. 437–440.
12. Dulbecco R. I geni e il nostro futuro (Collana Scienza). — Sperling & Kupfer, 1995. — 219 p.
13. Dulbecco R. Il progetto della vita. — Mondadori, 1989.
14. Dulbecco R. La mappa della vita. L'interpretazione del codice genetico: una revolution scientifica al servizio dell'humana. — Sperling & Kupfer, 2001. — 272 p.
15. Dulbecco R. Nobel Lecture. 1975. www.nobelprize.org.
16. Dulbecco R. Reactivation of ultra-violet-inactivated bacteriophage by visible light // Nature. — 1949. — Vol. 163. — P. 949–950.
17. Dulbecco R. Scienza, vita e avventura. — Sperling & Kupfer, 2001. — 310 p.
18. Dulbecco R. The control of cell growth regulation by tumour inducing viruses: a challenging problem // Proc. Royal Society. Lond. B. — 1975. — Vol. 189. — P. 1–14.
19. Dulbecco R. The Design of Life. 3<sup>rd</sup> ed. — Yale University Press, New Haven and London, 1987. — 458 p.
20. Dulbecco R. The number of particles of bacteriophage T2 that can participate in intracellular growth // Genetics. — 1949. — Vol. 34. — P. 126–132.
21. Dulbecco R. Transformation of cells in vitro by DNA-containing viruses // JAMA. — 1964 Nov 23. — Vol. 190. — No. 8. — P. 721–726.
22. Dulbecco R., and Freeman G. Plaque production by the Polyoma virus // Virology. — 1959. — Vol. 8. — P. 396–397.
23. Dulbecco R., and Ginsberg H.S. Virology. — Philadelphia: Lippincott, 1988. — 398 p.
24. Dulbecco R., and Vogt M. Significance of continued virus production in tissue cultures rendered neoplastic by Polyoma virus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1960. — Vol. 46. — P. 1617–1623.
25. Dulbecco R., Chiaberge R. Ingegneri della vita. Medicina e morale nell'era del DNA. — Milano, 1988. — 158 p.
26. Dulbecco R., Vogt M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses // J. Exp. Med. — 1954. — Vol. 99(2). — P. 167–182.
27. Dulbecco Renato. Interview with Renato Dulbecco [Oral History] (Unpublished). — 2001. <http://oralhistories.library.caltech.edu/26/>.
28. Eckhart W. Renato Dulbecco: Viruses, genes, and cancer // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2012 Mar 27. — Vol. 109(13). — P. 4713–4714.
29. [http://en.wikipedia.org/wiki/Renato\\_Dulbecco](http://en.wikipedia.org/wiki/Renato_Dulbecco).
30. <http://line4.org/page/search2?keyword=renato+dulbecco>.
31. <http://www.salk.edu/faculty/dulbecco.html>.
32. Luria S.E., and Dulbecco R. Genetic recombinations leading to production of active bacteriophage from ultraviolet inactivated bacteriophage particles // Genetics. — Mar. 1949. — Vol. 34(2). — P. 93–125.
33. Marguerite Vogt — Wikipedia. [www.en.wikipedia.org/wiki/Marguerite\\_Vogt](http://www.en.wikipedia.org/wiki/Marguerite_Vogt).
34. Renato Dulbecco — Biographical / In: Les Prix Nobel en 1975. Wilhelm Odelberg (Ed.). — Stockholm, 1976. См. также [www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org).
35. Verma I.M. Renato Dulbecco (1914–2012) // Nature. — 2012. — Vol. 483(7390). — P. 408.
36. Vogt M., and Dulbecco R. Virus-cell interaction with a tumor-producing virus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1960. — Vol. 46(3). — P. 365–370.

**Резюме.** Статья посвящена 100-летней годовщине со дня рождения Ренато Дульбекко (1914–2012), выдающегося молекулярного биолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине за открытия, касающиеся взаимодействия между вирусами опухолей и генетическим материалом опухолей.

*Ключевые слова:* история науки, молекулярная биология, вирусология, канцерогенез, биография, Ренато Дульбекко.

## **THE 100<sup>th</sup> ANNIVERSARY OF RENATO DULBECCO – EMINENT MOLECULAR BIOLOGIST OF XX CENTURY**

V.S. VOROBYEV

*Ju.A. Ovchinnikov Russian Society of Biotechnology, Moscow*

The article is devoted to the 100<sup>th</sup> anniversary of the birth of Renato Dulbecco (1914–2012), an eminent molecular biologist and Nobel Prize winner in Physiology or Medicine for discoveries concerning the interaction between tumor viruses and the genetic material of tumors.

*Keywords:* history of science, molecular biology, virology, carcinogenesis, biography, Renato Dulbecco.

## СОБЫТИЯ 2014 ГОДА

## РЕЗОЛЮЦИЯ

**Второго Международного экономического форума  
«БиоКиров-2014»  
(Киров, 17–19 июня 2014 г.)**

17–19 июня 2014 года в г. Кирове состоялся Второй Международный экономический форум «БиоКиров-2014» с основной темой «Построение региональной биоэкономики: проблемы и решения». В рамках форума, наряду с федеральным и международным уровнем рассмотрения проблемы, прошло обсуждение региональных возможностей внедрения нового перспективного направления — биоэкономики как современной интегрированной модели ресурсосберегающей экономики, основанной на широком использовании в различных отраслях экономики биотехнологий и связанных с ней высоких технологий.

Главная повестка дня мероприятия была посвящена анализу хода реализации «Комплексной программы развития биотехнологии в Российской Федерации на период до 2020 года», Дорожной карты развития биотехнологий и геномной инженерии (утверждена Правительством РФ 18.07.2013 г. № 1247-р), а также выполнению поручений Президента РФ В.В. Путина, обозначенных в его Послании Федеральному Собранию (декабрь 2013 года). Значительное внимание было уделено ходу выполнения решений, сформулированных на заседании Президиума Совета при Президенте России по модернизации экономики и инновационному развитию в области возобновляемых источников (4 февраля 2014 года в г. Белгороде), в том числе по подготовке и реализации комплекса мер, направленных на поддержку существующих и создание новых научно-технологических центров масштабирования (пилотных центров) для разработки и последующей коммерциализации технологий с использованием возобновляемых источников, а также подготовки предложений по прикладным НИР и НИОКР в области промышленных биотехнологий, лесопромышленного комплекса, агробiotехнологий и биоэнергетики для финансирования в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы».

Основными направлениями дискуссий в рамках программы форума стали:

- биотехнология: новые возможности для медицины;
- актуальные проблемы и перспективы развития биофармацевтики;

- агробiotехнологии и продукты питания;
- биоресурсная база как основа развития биорегиона: промышленность и биоэнергетика;
- нормативно-правовое, экономическое, организационное и кадровое обеспечение развития биотехнологии на региональном уровне;
- биотехнология и общество: социогуманитарные и этические проблемы современной биотехнологии.

На форуме состоялось 12 мероприятий (пленарные заседания, секции, круглые столы, рабочие совещания), выставка, а также молодежная научно-практическая конференция.

В работе форума приняли участие свыше 1000 ученых, специалистов, практиков из 31 региона Российской Федерации, 6 зарубежных стран. Участвовали Председатель Правительства Российской Федерации Д.А. Медведев, полномочный представитель Президента РФ в Приволжском Федеральном округе М.В. Бабич, представители 8 федеральных министерств и ведомств.

В рамках форума подписан ряд соглашений по развитию промышленности и сельского хозяйства в Кировской области, реализации проектов в сфере ЖКХ, распределенной энергетики на основе местных биоресурсов, охраны окружающей среды, биогеоинформационных технологий, подготовки высококвалифицированных кадров для биотехнологической отрасли. Выполнение указанных соглашений и инвестиционных проектов в Кировской области обеспечит существенный вклад в ускорение роста отечественной экономики.

Участники форума отметили, что биоэкономика является новым этапом инновационного развития государства и открывает уникальные возможности для ускоренного и гармоничного социально-экономического роста регионов Российской Федерации на основе эффективного использования местных возобновляемых ресурсов, биотехнологий и других современных высоких технологий. В то же время для реализации этих возможностей необходимо решить ряд вопросов по совершенствованию законодательной и нормативно-правовой базы на федеральном и региональном уровнях, созданию благоприятных условий для инвестиций в сферу биоэкономики, осуществить комплекс социально-экономических мероприятий. Эффективным инструментом по интенсификации и координации практической деятельности в этой сфере являются профильные технологические платформы («Медицина будущего», «Биотех-2030»,

«Биоэнергетика» и др.). Одним из ключевых направлений их деятельности должно стать также укрепление коммуникаций и сотрудничества на международном уровне, включая поддержку и содействие международным проектам в рамках евразийской интеграции.

Всесторонне обсудив наиболее актуальные проблемы развития биотехнологии в стране на федеральном и региональном уровнях, участники форума ПРИНЯЛИ СЛЕДУЮЩЕЕ РЕШЕНИЕ:

## **I. ПРИОРИТЕТЫ БИОЭКОНОМИКИ:**

### **По направлению биомедицины и биофармацевтики:**

1. В связи с тем, что развитие фармацевтических и медицинских биотехнологий служит определяющим фактором для повышения качества медицинской помощи населению и лечения социально значимых заболеваний, обеспечения устойчивого развития общества и национальной безопасности, неотъемлемым условием широкого внедрения фармацевтических и медицинских биотехнологий является государственная поддержка фундаментальных исследований и использования их результатов в прикладных разработках, направленных на создание и запуск новых промышленных технологий производства лекарственных и диагностических средств и методов профилактической медицины, разработку и внедрение методов и стандартов цифровой и персонализированной медицины.

2. Считать первоочередной задачей в сфере биофармацевтики обеспечение производства жизненно важных препаратов с целью удовлетворения потребностей населения и осуществления импортозамещения в соответствии с целевыми показателями программ ФАРМА-2020 и БИО-2020.

3. В сфере биомедицины считать важнейшей задачей поддержку профильных отечественных предприятий и организаций, осуществляющих деятельность на основе инновационных технологий.

4. Рассматривать в качестве значимого приоритета формирование современной инфраструктуры биофармацевтической и медицинской промышленности, в том числе в форме территориальных биокластеров.

5. Обеспечить достаточную сеть должным образом оснащенных испытательных и контрольных центров для осуществления надзора за соблюдением внутрипроизводственных стандартов и требований к качеству биомедицинской и биофармацевтической продукции и к условиям ее производства, а также для контроля качества продукции, находящейся в обороте.

5. Считать целесообразной целевую поддержку проектов, предусматривающих организацию производства отечественных импортозамещающих вакцин, биофармацевтических препаратов для лечения социально значимых заболеваний, биосовместимых материалов, современных диагностикумов, создание центров доклинических и клинических исследований.

### **По направлению агробиотехнологии, аквакультур и продуктов питания:**

1. Считать актуальной задачей внедрение биотехнологических методов в сельское хозяйство — растениеводство, животноводство и рыбоводство.

2. В число наиболее приоритетных задач необходимо включить:

- органическое земледелие;
- вермикультуры;
- отечественные ветеринарные препараты и вакцины;
- микробиологические средства роста и защиты растений;
- внедрение экологически безопасных, ресурсосберегающих технологий в растениеводстве и животноводстве, создание безотходных энергоэффективных производств;
- сохранение и восстановление плодородия почв земель сельскохозяйственного назначения и агроландшафтов как национального достояния России;
- использование заброшенных и пустующих земель для выращивания «энергетических культур» в качестве биомассы для биоэнергетики.

3. Рассматривать в качестве важнейшей задачи подготовку кадров в сфере агробиотехнологии на базе ведущих профильных университетов (Москва, Казань, Киров, Воронеж, Красноярск, Саратов и др.).

4. Считать социально и производственно востребованным направлением создание в масштабах страны биотехнологических комплексов для нужд сельского хозяйства:

- строительство предприятий по производству лизина, метионина и других аминокислот;
- строительство заводов по глубокой переработке зерна с получением крахмала, глюкозо-фруктозных сиропов и других продуктов;
- создание аквабиотехнопарков и центров аквакультуры в прибрежных зонах и на базе крупных рыбоводческих хозяйств.

5. Поддерживать целевые биотехнологические проекты по животноводству и ветеринарии, направленные на оздоровление поголовья сельскохозяйственных



животных, создание генофондных племенных предприятий, разведение животных чистых пород, повышение качества кормов.

#### **По направлению промышленной биотехнологии:**

1. Рассматривать в качестве актуальной задачи разработку и внедрение технологий производства базовых химических соединений с использованием методов современной биоиндустрии.

2. Поддерживать целевые проекты по:

- созданию современных производств бионаноматериалов и биофункциональных материалов, биополимеров, включая биodeградируемые полимеры;
- созданию комплексов по глубокой переработке биомассы с получением ценных продуктов с высокой добавленной стоимостью (биорефайнинг).

#### **По направлению биоэнергетики:**

1. Считать перспективной поддержкой развития биоэнергетики в субъектах Российской Федерации, обладающих достаточными запасами биоресурсов (древесная биомасса, торф, органические отходы) для производства различных видов твердого биотоплива, транспортных биотоплив, биогаза и других видов возобновляемых источников энергии, а также для энергетической утилизации отходов промышленных производств и АПК.

2. Рассматривать в качестве приоритетных проекты, обеспечивающие развитие малой распределенной энергетики на основе использования локальной биоресурсной базы в отдаленных и сельских территориях, в районах неустойчивого централизованного энергоснабжения или его полного отсутствия, а также направленные на решение проблемы «северного завоза».

3. Осуществлять приоритетную поддержку пилотных проектов, представленных Технологической платформой «Биоэнергетика» в соответствии с поручением заместителя Председателя Правительства Российской Федерации А.В. Дворковича по итогам заседания президиума Совета при Президенте Российской Федерации по модернизации экономики и инновационному развитию России 4 февраля 2014 г. (от 14 февраля 2014 г. № АД-П9-1047).

4. Поддерживать целевые проекты по созданию комплексов по глубокой переработке торфа и органических отходов на территориях с большим ресурсным потенциалом (Кировская, Владимирская, Смоленская, Псковская, Калининградская области и др.).

#### **По направлению лесной биотехнологии:**

1. Считать приоритетной задачей развитие лесной биотехнологии в лесных регионах с целью защиты и восста-

новления лесных ресурсов с применением биологических средств, эффективного управления лесонасаждениями, сохранения биоразнообразия и сложившихся экосистем леса.

2. Рассматривать в качестве приоритетных проекты по:

- созданию комплексов по глубокой переработке древесной биомассы на территориях с большим ресурсным потенциалом (Красноярский и Хабаровский края, Республика Карелия, Кировская область и др.);
- разработке технологий и культивированию плантаций быстрорастущих деревьев («быстрый лес»);
- переработке отходов лесопромышленного комплекса в целях биоэнергетики.

#### **По направлению экобиотехнологии:**

1. Рассматривать в качестве важнейшей задачи поддержку и развитие биологических коллекций, формирование сети биоресурсных центров.

2. Осуществлять приоритетную поддержку проектов, направленных на:

- биоремедиацию почв и вод;
- утилизацию отходов АПК, ЛПК, ЖКХ и др.

## **II. СТИМУЛИРОВАНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ БИОЭКОНОМИКИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ:**

Стимулирование формирования биоэкономики в Российской Федерации требует реализации комплекса приоритетных мер, в связи с чем считать целесообразным:

1. Рекомендовать федеральным органам исполнительной власти Российской Федерации:

1.1. Рассматривать в качестве приоритетной задачу формирования биоэкономики в Российской Федерации и с этой целью:

1.1.1. Поддерживать реализацию нескольких пилотных проектов (3–5) по формированию биорегионов с различными природно-климатическими, социально-экономическими и демографическими условиями, отобрав их на конкурсной основе.

1.1.2. Поддерживать реализацию нескольких пилотных проектов (5–10) биоэкополисов — высокотехнологичных поселений, деятельность которых основана на принципах биоэкономики.

1.1.3. Поддерживать создание сети научно-технологических центров (центров масштабирования, инжиниринговых центров) в области биотехнологий.

1.1.4. Поддерживать создание национальной биогеоинформационной системы мониторинга и прогнозирования биоресурсной базы и биоэкономики.

1.1.5. Инициировать разработку системы мер по созданию условий для активизации использования передовых экономических механизмов (преобразующие инвестиции) в сфере биоэкономики.

1.2. Ускорить разработку и принятие нормативно-правовых актов, направленных на стимулирование использования продукции из возобновляемых источников сырья, в том числе на формирование стимулов для предприятий малого и среднего бизнеса в целях реализации биотехнологических проектов.

1.3. Предусмотреть в рамках создания федеральной контрактной системы в сфере закупок товаров, работ и услуг, а также в рамках государственного оборонного заказа механизмов и инструментов поддержки, направленных на внедрение передовых отечественных технологий, создание и развитие рынков сбыта биотехнологической продукции, в том числе биотоплива.

1.4. Предусмотреть при корректировке Генеральной схемы развития объектов энергетики увеличение в объеме вновь вводимой генерации доли объектов энергетики на местных и возобновляемых источниках энергии.

1.5. Разработать механизмы поэтапного введения на оптовом рынке квот на покупку электроэнергии, выработанной на генераторах, работающих на возобновляемых источниках энергии.

1.6. Предусмотреть налоговое, таможенное и тарифное стимулирование инвестиционных проектов в области биотехнологий, а также в части производителей и перевозчиков биотехнологической продукции (включая биотопливо и органическую сельскохозяйственную продукцию); поэтапное введение более строгих экологических стандартов, стимулирующих расширение практики утилизации отходов производства и потребления, в том числе с применением биотехнологий.

1.7. Пересмотреть методологию установления тарифов в сфере жилищно-коммунального хозяйства с возможностью применения коэффициентов по инвестиционной (индустриальной) составляющей, направленной на переработку отходов во вторичное сырье и использования в качестве возобновляемых источников энергии; дифференцированных тарифов на размещение сортированных и несортированных отходов, а также отходов, направляемых на утилизацию и захоронение; применять индикативные тарифы в зависимости от вида используемого топлива с целью выравнивания экономической нагрузки на население.

1.8. В целях перевода объектов коммунального хозяйства субъектов РФ на местные виды топлива предусмотреть меры поддержки региональных жилищно-

коммунальных комплексов при использовании биомассы, торфа, органических отходов в качестве альтернативных источников энергии.

1.9. Ускорить разработку предложений по мерам поддержки субъектов Российской Федерации по созданию условий, стимулирующих увеличение использования низкосортной древесины и отходов древесного сырья, в том числе в коммунальной энергетике.

1.10. Осуществлять поддержку торфодобывающей отрасли как важного в условиях России направления развития возобновляемых источников, в связи с чем при разработке мер поддержки биоэнергетической отрасли учитывать и распространять принимаемые решения на процессы, происходящие в торфодобывающей отрасли, тем самым постепенно переводя ее из-под юрисдикции горного права во вновь формируемое правовое поле биоэнергетического кластера. В качестве первоочередной меры поддержки торфодобывающей отрасли рассмотреть возможность субсидирования железнодорожных перевозок при организации внутрирегиональных перевозок торфа и продуктов его переработки.

1.11. Установить минимальные объемы вновь вводимых генерирующими компаниями мощностей, функционирующих на основе местных и широко распространенных биологических топливно-энергетических ресурсов, а также приравненного к ним полезного ископаемого — торфа.

1.12. Учитывая значительные объемы добычи и использования торфа в экономике Кировской области, рассмотреть возможность создания в Кировской области научно-технологического центра масштабирования для разработки и последующего развития технологической основы использования торфа и древесного биотоплива на объектах коммунальной и промышленной энергетике.

1.13. Внести изменения в ст. 3 Федерального закона от 26 марта 2003 г. № 35-ФЗ «Об электроэнергетике», включив торф в перечень возобновляемых источников энергии.

1.14. При корректировке Государственной программы Российской Федерации «Энергоэффективность и развитие энергетики» на период до 2020 года включить в ее состав мероприятия по разработке технологий, развитию производства и формированию рынка продуктов биоэнергетики (твердого, жидкого биотоплива, биогаза и др.), а также предусмотреть комплекс мер по созданию благоприятных условий для экспорта биотоплива.

2. Считаю целесообразным Федеральному Собранию Российской Федерации рассмотреть возможность:

2.1. Ускорения принятия проекта Федерального закона о внесении изменений в Федеральный закон «Об отходах производства и потребления» и других законодательных актов Российской Федерации в части определения понятия «вторичные материальные ресурсы» и разграничения понятий «отходы» и «вторичные материальные ресурсы», введении законодательной нормы о поэтапном запрещении захоронения отходов, отнесенных к вторичным материальным ресурсам и возобновляемым источникам энергии, экономическом стимулировании деятельности в сфере биотехнологий с использованием углубленной переработки отходов производства и потребления.

2.2. Ускорения принятия проекта Федерального закона «Об основах развития биоэнергетики в Российской Федерации» и проекта Федерального закона «О развитии производства и потреблении биологических видов топлива».

3. Субъектам Российской Федерации считаем целесообразным рассмотреть возможность:

3.1. Формирования «биорегионов» на основе разработки и реализации региональных программ развития биоэкономики, включая приоритетную поддержку биоэнергетической отрасли и инфраструктуры использования биоресурсов в региональных энергетических комплексах, в том числе перевода объектов энергетического хозяйства на местные виды топлива.

3.2. Изучения опыта работы субъектов Российской Федерации (Кировской и Нижегородской областей) по формированию эффективной системы управления отходами потребления и вторичными материальными ресурсами.

3.3. Активизации деятельности по разработке и реализации стратегий модернизации и развития энергетического хозяйства муниципальных образований.

3.4. Использования позитивного опыта ряда субъектов Российской Федерации по созданию биотехнопарков и биокластеров как базовых структур для формирования биорегионов (Московская, Кировская, Калужская, Томская, Новосибирская области, Республика Татарстан и др.).

4. Муниципальным образованиям Российской Федерации считаем целесообразным рассмотреть возможность:

4.1. Активного внедрения достижений биотехнологии в хозяйственной и экономической деятельности муниципалитетов, в первую очередь, в ЖКХ, энергосбережении и природоохранной деятельности.

4.2. Разработки программы развития энергетической инфраструктуры в составе программ комплексного

социально-экономического развития муниципальных образований.

4.3. Разработки и реализации программы перевода муниципальных котельных на местные виды топлива.

4.4. Разработки и реализации планов строительства (модернизации) экономически оправданных малых генерирующих мощностей на местных и широко распространенных биологических топливно-энергетических ресурсах, а также приравненном к ним полезном ископаемом — торфе.

### **III. РЕКОМЕНДАЦИИ ГОСУДАРСТВЕННЫМ ОРГАНАМ КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ:**

1. Правительству и Законодательному собранию обобщить опыт реализации региональных программ в сфере биотехнологии и разработать типовую программу формирования биорегиона.

2. Правительству активизировать межрегиональное сотрудничество в области биотехнологии и выступить с инициативой формирования Ассоциации биорегионов России.

### **СОВЕЩАНИЕ**

**у заместителя Председателя Правительства Российской Федерации А.В. Дворковича**  
**«О ходе реализации Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года, утвержденной Председателем Правительства Российской Федерации 24 апреля 2012 года № 1853п-П8, и плана мероприятий («дорожной карты») «Развитие биотехнологий и геномной инженерии», утвержденной распоряжением Правительства Российской Федерации от 18 июля 2013 года № 1247-р» (Москва, 27 июня 2014 г.)**

27 июня 2014 года состоялось совещание у заместителя Председателя Правительства Российской Федерации А.В. Дворковича, посвященное выполнению мероприятий Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года (далее — Программа БИО-2020, Программа). С базовым докладом выступил статс-секретарь — заместитель Министра экономического развития Российской Федерации О.В. Фомичев. В обсуждении доклада участвовали представители профильных министерств. По результатам совещания принято решение.

Основные положения доклада О.В. Фомичева:

1. Во вводной части представлена информация о ходе реализации указанной Программы. При этом главное внимание было уделено выполнению плана мероприятий (План БИО-2020, План) — дорожной карты, принятой в июле 2013 года в развитие целевых установок Программы.

Среди основных проблем, связанных с реализацией Программы БИО-2020, отмечается недостаточность бюджетного финансирования (особенно по линии государственных программ РФ). Констатируется также низкая активность биотехнологического бизнеса. Решение проблем видится в выделении дополнительных финансовых ресурсов и выстраивании приоритетов расходов. Требуются изменения в Программе и Планах в связи с текущими решениями руководящих федеральных органов. Информирована об исполнении конкретных пунктов Плана по состоянию на конец апреля 2014 года.

2. Материал анализируется по двум блокам: I. Реализация системных мер и II. Реализация мер по развитию отдельных направлений биотехнологий.

По первому блоку рассмотрены следующие вопросы: развитие исследований и разработок; развитие системы подготовки и повышения квалификации научных, инженерно-технических и управленческих кадров; развитие производственного потенциала и производственной кооперации; совершенствование государственного регулирования в области биотехнологий; технологическое развитие в регионах; развитие международного сотрудничества; создание и развитие механизмов координации деятельности организаций отрасли.

Во втором блоке оценивалась работа по таким направлениям, как биофармацевтика, биомедицина, промышленная биотехнология, биоэнергетика, морская биотехнология, агробиотехнология (сельское хозяйство и пищевая промышленность), лесная биотехнология, геномная инженерия.

3. В разделе «Развитие исследований и разработок», наряду с другими важными аспектами, рассмотрено состояние дел с созданием национальных биоресурсных центров как базы для развития отечественной биотехнологии. По результатам конкурса Минобрнауки России заключены государственные контракты с тремя победителями, обладающими уникальными биологическими коллекциями: ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН», ГНУ «Всероссийский НИИ животноводства РАСХН», ФГУП «Государственный НИИ генетики и селекции

промышленных микроорганизмов». Другим существенным продвижением является проведение Минобрнауки России конкурса на 147 лотов, сформированных по предложениям технологических платформ: в результате на 2013 год было заключено 460 государственных контрактов на сумму около 3 миллиардов рублей.

4. В разделе «Развитие системы подготовки и повышения квалификации научных, инженерно-технических и управленческих кадров» осуществлена деятельность по подготовке соответствующих писем и предложений в профильные министерства и в аппарат Правительства РФ.

5. В разделе «Развитие производственного потенциала и производственной кооперации» отмечены организационные трудности в формировании пилотных центров в сфере биотехнологий.

6. В разделе «Совершенствование государственного регулирования в области биотехнологий» ведется деятельность по разработке проекта технических регламентов Таможенного союза в отношении продукции, относящейся к биотехнологической. Создается проект Программы разработки национальных стандартов в области биологических средств защиты леса. Ведется работа по совершенствованию технических регламентов РФ в отношении пищевых продуктов, в том числе в контексте использования ГМО. Утвержден план-график разработки и принятия нормативно-правовых актов с целью облегчения ввоза и вывоза из РФ материалов для научных исследований.

7. В разделе «Технологическое развитие в регионах» уделено внимание порядку финансовой поддержки инновационных территориальных кластеров, а также рассмотрению организационных вопросов.

8. В разделе «Развитие международного сотрудничества»: Минэкономразвития России разработало план мер по организации международного сотрудничества в области развития биотехнологии и подготовки предложений по расширению перечня проводимых за рубежом выставок и ярмарок в сфере биотехнологии. Соответствующий план участия в выставочно-ярмарочных и конгрессных мероприятиях составлен Минобрнауки России.

9. В разделе «Создание и развитие механизмов координации деятельности организаций отрасли» — Минэкономразвития России представило доклад в Правительство РФ о создании системы статистического учета в сфере биотехнологий.

10. По направлению «Биофармацевтика» осуществлен комплекс мер, в их числе:

- Минздрав России подготовил и направил в Правительство РФ предложения по законодательству Российской Федерации в части требований к госрегистрации и обращению биологических и лекарственных препаратов с учетом стран ЕС и рекомендаций ВОЗ;

- Минздрав России разрабатывает концепцию ФЦП «Развитие инновационных медицинских технологий в Российской Федерации на период до 2020 года», в которой предусмотрено создание центров доклинических трансляционных исследований;

- направлен в Правительство РФ доклад Минпромторга России о разработке предложений по стимулированию спроса на отечественные инновационные лекарства, в том числе биотехнологические.

11. По направлению «Биомедицина»: Минздравом России ведется комплексная работа, в рамках которой биомедицинское направление активно поддерживается. К числу крайне важных достижений следует отнести разработку и внесение в Правительство РФ проекта федерального закона об обращении биомедицинских клеточных продуктов.

12. По направлению «Промышленная биотехнология»:

- Минпромторгом России подготовлены проекты новых подпрограмм «Промышленная биотехнология», «Развитие инжиниринга», внесены изменения в подпрограммы «Развитие лесного комплекса» и «Химический комплекс» и в составе государственной программы «Развитие промышленности и повышение ее конкурентоспособности» представлены в Правительство РФ (программа утверждена Постановлением Правительства РФ от 15.04.2014 г. № 328).

- Правительством РФ и рядом министерств (Минсельхоз России, Минпромторг России, Минрегион России) подготовлен ряд постановлений и приказов, поддерживающих развитие сектора промышленной биотехнологии.

13. По направлению «Биоэнергетика»:

- ведется работа по правовой и организационной поддержке промышленного производства биоэтанола;

- разрабатывается проект ФЗ «О развитии производства и потребления биологических видов топлива».

14. По направлению «Морская биотехнология»:

- Росрыболовство совместно с Минсельхозом России завершена деятельность по принятию законопроекта об аквакультуре. Федеральный закон от 02.07.2013 г. № 48-ФЗ «Об аквакультуре» вступил в силу с 1 января 2014 года.

- в рамках различных программ, включая БИО-2020, Росрыболовство организует работу по созданию региональных аквабиоцентров (Владивосток, Мурманск).

15. По направлению «Агробиотехнология (сельское хозяйство и пищевая промышленность)»:

- проводится работа по формированию нормативно-правовой базы по агропищевым технологиям;

- прорабатывается вопрос о создании учебно-методического объединения по агропищевой биотехнологии на базе ФГБОУ ВПО «Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева»;

- ряд исполнителей проектов данного направления предлагается исключить (например, от проекта «Создание центров функциональной геномики сельскохозяйственных растений» отстранить Минсельхоз России).

16. По направлению «Лесная биотехнология»:

- созданы две ДНК-лаборатории в сети лабораторий мониторинга состояния лесных генетических ресурсов (Алтайский край, Воронежская область);

- планируется организация на базе ФБУ «Рослесозащита» Центра коллективного пользования «ДНК-технологии в лесном хозяйстве»;

- предложено перенести срок реализации пункта о включении национальных стандартов на биологические средства защиты леса (с 2014 г. на 2016 г.).

17. По направлению «Генная инженерия»:

- принято Постановление Правительства РФ от 23.09.2013 г. № 839 «О государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов, предназначенных для выпуска в окружающую среду, а также продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы»;

- во исполнение указанного постановления начата государственная регистрация Роспотребнадзором пищевых продуктов, полученных с использованием генно-инженерно-модифицированных (трансгенных) организмов, включая генно-модифицированные микроорганизмы в порядке, предусмотренном решениями Комиссии Таможенного союза. Минздравом России разрабатывается проект приказа о порядке проведения мониторинга воздействия на человека и окружающую среду ГМО и продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы;

- готовится приказ Минобрнауки России об утверждении общероссийского классификатора генных модификаций растений (пройден этап его общественного обсуждения в сети Интернет).

1. Рукописи статей и других материалов представляются в редакцию на бумажном носителе (формат А4) или в электронном виде (на дискете или по электронной почте с обязательным уведомлением).
2. Текст набирается в Microsoft Word, шрифт — Times New Roman, размер шрифта — 12, межстрочный интервал — полуторный. Размещение на листе формата А4 со стандартными полями. Кроме текста статьи, добавляются сведения об авторе (ах): Ф.И.О., место работы, должность, научные степень и звание, адреса для переписки и электронной связи, номера факсов и телефонов). Необходимо сопроводительное письмо из учреждения.
3. Объем рукописи: оригинальные статьи — не более 12–14 стр. (в среднем 22000 знаков), не более 25 цитированных авторов; обзоры — не более 20–24 стр. (в среднем 40000 знаков), список литературы — не более 50 авторов. Требования к композиции рукописи: 1) оригинальные статьи — УДК, название, автор (ы), место работы, резюме на русском и английском языках, ключевые слова, введение, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение (выводы), литература, список сокращений; 2) краткие сообщения и обзоры строятся в виде сплошного текста, без вышеуказанных рубрикации, со списком литературы, резюме на русском и английском языках; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде в формате TIF или JPEG. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале — литература на русском языке, затем — на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми

---

для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные 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](http://www.biorosinfo.ru)).



Подписано к печати 30.06.14  
Формат 60/90<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. 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](mailto: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*