

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

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

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

Редакционный совет

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

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

Зав. редакцией О.В. Воробьева

Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

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

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем»

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

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Васильев* 4

Оригинальные статьи

Линия клеток с экспрессией рекомбинантного β_1 -адренорецептора для определения уровня аутоантител-агонистов методом конкурентного иммуноферментного анализа.

А.Я. Шевелев, Н.М. Каширина, И.Б. Кузнецова, Т.В. Шарф, Е.Н. Мамочкина, О.Ю. Агапова, Т.Х. Гурская, Л.Н. Липатова, М.М. Пекло, П.Н. Руткевич, Е.В. Янушевская, И.Н. Рыбалкин, Ю.С. Скоблов, Е.Е. Ефремов, Т.Н. Власик, К.А. Зыков 5

Исследование структурных характеристик, гранулометрического состава и биологических свойств молекулярной конструкции, содержащей аналог интерферона-гамма.

О.С. Иванова, А.А. Ломзов, Г.М. Левагина, А.В. Батенева, Л.Н. Шишкина, М.О. Скарнович, М.А. Скарнович, В.И. Масычева, Е.Д. Даниленко 15

Эффективность фотосинтеза и удельная скорость прироста численности популяции микроводорослей при действии фотосенсибилизатора и шунгита.

Г.А. Даллакян 21

Исследование эффективности сохранения цианобактерий *Arthrospira platensis* и *Spirulina subsalsa* после криоконсервации диметилсульфоксидом при -80°C .

Д.И. Петрухина, И.Н. Лыков 26

Оценка влияния стимуляторов роста на динамику образования лигнолитических ферментов *Trametes gibbosa*.

Е.Э. Хабибулина, А.С. Белянин, Е.А. Бессолицына, И.В. Дармов 31

Обзоры

Оценка сырьевой базы Российской Федерации для производства топлива и энергии из биомассы.

Э.Б. Намсараев, П.М. Готовцев, А.В. Комова, А.В. Борголов, Я.Э. Сергеева, Р.Г. Васильев 41

Страницы истории

К 80-летию выхода в свет статьи Н.В. Тимофеева-Ресовского, К. Циммера и М. Дельбрюка — важной вехи в истории молекулярной биологии.

О.В. Воробьева 48

К 80-летию открытия А.Н. Белозерским ДНК в растениях.

В.С. Воробьев 54

Хроника 60

Правила для авторов 62

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

Cell line expressing recombinant β_1 -adrenergic receptor for the agonistic autoantibodies detection by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay.

A.Y. Shevelev, N.M. Kashirina, T.B. Kuznetsova, T.V. Sharf, E.N. Mamochkina, O.Y. Agapova, T.Kh. Gurskaya, L.N. Lipatova, M.M. Peklo, P.N. Rutkevich, E.V. Yanushevskaya, I.N. Rybalkin, Y.S. Skoblov, E.E. Efremov, T.N. Vlasik, K.A. Zykov 5

Investigation of the structural characteristics, particle size distribution and biological properties of the molecular construct comprising gamma-interferon analogue.

O.S. Ivanova, A.A. Lomzov, G.M. Levagina, A.V. Bateneva, L.N. Shishkina, M.O. Skarnovich, M.A. Skarnovich, V.I. Masycheva, E.D. Danilenko 15

The efficiency of photosynthesis, and the specific rate of growth in the number of algae populations under the action of a photosensitizer and shungite.

G.A. Dallakyan 21

Investigation of the effectiveness of conservation cyanobacteria *Arthrospira platensis* and *Spirulina subsalsa* after cryopreservation at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ by dimethyl sulfoxide.

D.I. Petrukhina, I.N. Lykov 26

Evaluation of the effect of growth factors on the dynamics of the formation of enzymes lignolytic *Trametes gibbosa*.

E.E. Khabibulina, A.S. Belyanin, E.A. Bessolitsyna, I.V. Darmov 31

Reviews

Evaluation of raw material base of the Russian Federation for the production of fuels and energy from biomass.

Z.B. Namsaraev, P.M. Gotovtsev, A.V. Komova, A.V. Borgolov, Y.E. Sergeeva, R.G. Vasilov 41

Pages of history

On the 80th anniversary of the publication of the article N.V. Timofeev-Ressovsky, K. Zimmer and M. Delbrück – a milestone in the history of molecular biology.

O.V. Vorobyeva 48

On the 80th anniversary of the discovery of DNA in plants made by A.N. Belozersky.

V.S. Vorobyev 54

The chronicle 60

Rules for authors 62

К читателям

В четвертом номере журнала за 2015 год представлена интересная подборка статей с разнообразной тематикой. Раздел «Оригинальные статьи» открывается обстоятельным исследованием коллектива авторов (Шевелев А.Я. с коллегами из Российского кардиологического научно-производственного комплекса и других учреждений), посвященным созданию стабильной клеточной линии, экспрессирующей рекомбинантный бета1-адренорецептор человека, и оптимизации соответствующего метода конкурентного ИФА в форме CELISA (cellular enzyme-linked immunosorbent assay) для определения уровня аутоантител к бета1-адренорецептору.

В работе Ивановой О.С. с соавторами из Бердска и Новосибирска (ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» и Институт химической биологии и фундаментальной медицины) изучались структурные характеристики гранулометрического состава и биологических свойств молекулярной конструкции, содержащей аналог интерферона-гамма.

В сообщении Даллакяна Г.А. (МГУ им. М.В. Ломоносова) приведены результаты исследования эффективности защиты от токсического действия фотосенсибилизатора (эозина) при различных способах обработки питательной среды шунгитом.

Петрухина Д.И., Лыков И.Н. (Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского) оценивали эффективность сохранения цианобактерий *Arthrospira platensis* и *Spirulina subsalsa* после криоконсервации диметилсульфоксидом при температуре -80°C и установили оптимальную длительность хранения проб.

Хабибулина Е.Э. с коллегами из Вятского государственного университета (Киров) изучали влияние стимуляторов роста на секрецию ферментов лигнолитического комплекса у *Trametes gibbosa*.

В обзоре Намсараева Э.Б. и др. (НИЦ «Курчатовский институт», Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского) проведена оценка сырьевой базы Российской Федерации для производства топлива и энергии из биомассы.

В исторической рубрике даны материалы в связи с памятливыми датами в развитии молекулярной биологии: статья О.В. Воробьевой о 80-летию выхода в свет классической работы Н.В. Тимофеева-Ресовского, К. Циммера, М. Дельбрюка о мутациях и структуре гена и статья В.С. Воробьева о 80-летию открытия А.Н. Белозерским наличия ДНК в растениях. Имеется небольшой раздел хроники.

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

ЛИНИЯ КЛЕТОК С ЭКСПРЕССИЕЙ РЕКОМБИНАНТНОГО β_1 -АДРЕНОРЕЦЕПТОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ АУТОАНТИТЕЛ-АГОНИСТОВ МЕТОДОМ КОНКУРЕНТНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

А.Я. ШЕВЕЛЕВ^{1,3*}, Н.М. КАШИРИНА¹, И.Б. КУЗНЕЦОВА¹, Т.В. ШАРФ¹,
Е.Н. МАМОЧКИНА¹, О.Ю. АГАПОВА², Т.Х. ГУРСКАЯ¹, Л.Н. ЛИПАТОВА^{1,3},
М.М. ПЕКЛО^{1,3}, П.Н. РУТКЕВИЧ^{1,3}, Е.В. ЯНУШЕВСКАЯ¹, И.Н. РЫБАЛКИН^{1,3},
Ю.С. СКОБЛОВ⁴, Е.Е. ЕФРЕМОВ¹, Т.Н. ВЛАСИК^{1,3}, К.А. ЗЫКОВ^{1,2}

¹НИИ экспериментальной кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России; ²Лаборатория пульмонологии НИМСИ Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова; ³ООО «МонА»; ⁴ФГБУН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Методом плазмидной трансфекции получена стабильная линия клеток человека, экспрессирующая рекомбинантный β_1 -адренорецептор в количестве $2,35 \pm 0,3 \cdot 10^6$ молекул на клетку. Функциональность рекомбинантного рецептора показана в экспериментах по индукции сАМР специфическим бета-адреностимулятором изопротеренолом. Подобраны условия фиксации клеток 0,025%-ным глутаровым альдегидом с последующей обработкой этаноламином и боргидридом натрия, позволяющей сохранить структуру антигена. Оптимизированы параметры конкурентного иммуноферментного анализа на клетках для определения аутоантител-агонистов к β_1 -адренорецептору с использованием мышинных рекомбинантных антител-конкурентов, направленных ко второй внеклеточной петле β_1 -адренорецептора. На модельной системе с химерными рекомбинантными антителами той же специфичности, имитирующими человеческие аутоантитела, продемонстрирована возможность измерения концентраций аутоантител-агонистов в диапазоне от 5 до 50 нг/мл.

Ключевые слова: β_1 -адренорецептор, аутоантитела-агонисты, трансфекция клеток, конкурентный иммуноферментный анализ, рекомбинантные антитела.

Введение

Аутоантитела к β_1 -адренорецептору могут вносить существенный вклад в патогенез ряда сердечно-сосудистых заболеваний, в первую очередь, дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) [6, 23]. При связывании с β_1 -адренорецептором аутоантител-агонистов происходит активация рецептора, сопровождающаяся передачей сигнала через G-белки и аденилатциклазу внутрь клетки

с повышением внутриклеточного уровня сАМР [20]. Постоянная стимуляция локализующихся в сердечной мышце β_1 -адренорецепторов аутоантителами оказывает кардиотоксическое действие, которое в конечном счете может приводить к хронической сердечной недостаточности [21]. Продemonстрирована способность аутоантител-агонистов индуцировать апоптоз кардиомиоцитов [17], а в экспериментах на животных показано развитие аритмии [25] и признаков ДКМП [15, 17] в результате введения поликлональных антител ко второй внеклеточной петле β_1 -адренорецептора.

Аутоантитела к β_1 -адренорецептору присутствуют в крови у 50–70% больных ДКМП [6, 20, 21, 23]. Их частота встречаемости повышена также у пациентов с нарушениями ритма и проводимости сердца [7]. Стимулирующим потенциалом в основном обладают аутоантитела ко второй внеклеточной петле рецептора (аминокислоты 197–222) и, в меньшей степени, к его первой внеклеточной петле (аминокислоты 121–132) [20, 24]. Выявление аутоантител-агонистов к β_1 -адренорецептору

© 2015 г. Шевелев А.Я., Каширина Н.М., Кузнецова И.Б., Шарф Т.В., Мамочкина Е.Н., Агапова О.Ю., Гурская Т.Х., Липатова Л.Н., Пекло М.М., Руткевич П.Н., Янушевская Е.В., Рыбалкин И.Н., Скоблов Ю.С., Ефремов Е.Е., Власик Т.Н., Зыков К.А.

* **Автор для переписки:**

Шевелев Александр Ясенович

к.б.н., вед. научн. сотр. лаборатории клеточной инженерии НИИ экспериментальной кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России
E-mail: a.shevelev@gmail.com

является актуальной задачей клинической практики: своевременное обнаружение таких антител у определенных категорий больных может стать обоснованием применения терапевтической иммунокоррекции (удаление аутоантител методом плазмафереза, иммуномодулирующая терапия), а периодический мониторинг уровня аутоантител позволит оценивать эффективность лечения у конкретного больного.

Для определения содержания аутоантител-агонистов к β_1 -адренорецептору используется несколько различных подходов. Наиболее адекватным считается метод измерения хронотропного эффекта на первичной культуре неонатальных кардиомиоцитов крысы [18]. Другой функциональный метод основан на детекции повышения внутриклеточной концентрации сАМР в трансгенных клетках с рекомбинантным β_1 -адренорецептором в ответ на обработку антителами [20]. Оба метода весьма трудоемки и требуют дорогостоящего приборного и программного оснащения. Поэтому чаще всего аутоантитела к β_1 -адренорецептору определяют при помощи иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием пептидов, соответствующих второй внеклеточной петле [19]. Иногда применяют комбинацию фрагментов первой и второй петли [2]. Однако результаты, получаемые методом пептидного ИФА, носят неоднозначный характер: оценка частоты встречаемости аутоантител ко второй внеклеточной петле у больных ДКМП (30–50%) [2, 7, 16, 19] оказывается существенно ниже частоты, измеренной каким-либо из функциональных методов, а количество положительных сигналов, определяемых у здоровых доноров, в некоторых работах слишком велико (19–27%) [2, 7]. По-видимому, такие расхождения объясняются отличием конформаций синтетических пептидов от природной конформации второй внеклеточной петли в составе рецептора и высокой конформационной чувствительностью антител-агонистов [16]. Применение нелинейного пептида с двумя S-S связями, имитирующего природную конформацию второй петли, также не позволило значимо увеличить эффективность определения аутоантител [3].

Недавно Хольтоффом и соавт. [13] был предложен новый перспективный подход к задаче определения антител-агонистов к β_1 -адренорецептору. Подход основан на принципе конкурентного ИФА в формате CELISA (cellular enzyme-linked immunosorbent assay) с использованием в качестве твердофазного носителя антигена культуры клеток насекомых, экспрессирующих рекомбинантный β_1 -адренорецептор человека. Экспонированный на поверхности клеток β_1 -адренорецептор находится

в природной конформации, что имеет определенные преимущества перед использованием синтетических пептидных фрагментов. Неудобство метода заключается в том, что в работе применяется транзитное заражение клеток бакуловирусом, несущим ген адренорецептора, как необходимая стадия, предшествующая проведению анализа, — процедура достаточно сложная и плохо воспроизводимая.

Целью настоящей работы явилось создание стабильной клеточной линии, экспрессирующей рекомбинантный β_1 -адренорецептор человека, и оптимизация соответствующего метода конкурентного ИФА в формате CELISA для определения уровня аутоантител к β_1 -адренорецептору.

Материалы и методы

Клеточные культуры и трансфекция. Клетки 293-Н (субклон линии HEK293 клеток почки эмбриона человека с улучшенной способностью прикрепления к субстрату, Life Technologies, США) культивировали в среде DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 mM L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина (все реактивы компании Invitrogen, США) в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С. Клетки трансфицировали плазмидной ДНК при помощи реагента Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Через 2 дня после трансфекции клетки высевали в 96-луночные планшеты в серийных разведениях и проводили селекцию индивидуальных клонов в присутствии 2 мкг/мл пурамицина (Invivogen, США) в течение 3 недель.

Клетки клонов-трансфектантов размножали, высевали в 96-луночные планшеты по 35000 клеток на лунку и определяли экспрессию β_1 -адренорецептора методом ИФА в формате CELISA с использованием рекомбинантных антител mAB2367 в концентрации 30 нг/мл при времени инкубации 1 ч, 25 °С. После проведения анализа планшеты с клетками окрашивали фиолетовым кристаллическим, как описано Ферштигом и соавт. [22], с целью нормировать сигнал ИФА на количество клеток клона, находящегося в лунке.

Синтез генов и плазмидные конструкции. Последовательность нуклеотидов, кодирующую β_1 -адренорецептор человека, оптимизировали для экспрессии в клетках человека при помощи алгоритма GeneGPS (DNA2.0, США) на основании известной аминокислотной последовательности (UniProtKB/Swiss-Prot: P08588.2). Синтез гена был проведен

компанией DNA2.0. Правильность нуклеотидной последовательности проверяли секвенированием, после чего оптимизированный ген встраивали в экспрессионный вектор рМС4IPW с получением плазмиды рМС4IPW-ADRB1opt (рис. 1). Бицистронный вектор рМС4IPW с промотором ранних генов цитомегаловируса несет ген устойчивости к антибиотику пурамицину, трансляционно сопряженный с экспрессируемым трансгеном через участок внутреннего связывания рибосом. Вектор также содержит ряд дополнительных функциональных элементов, которые, как показано нами ранее [4], усиливают экспрессию трансгена. Плазмидную ДНК выделяли из бактерий *E. coli* методом щелочного гидролиза с последующей обработкой РНК-азой А и осаждением полиэтиленгликолем 8000.

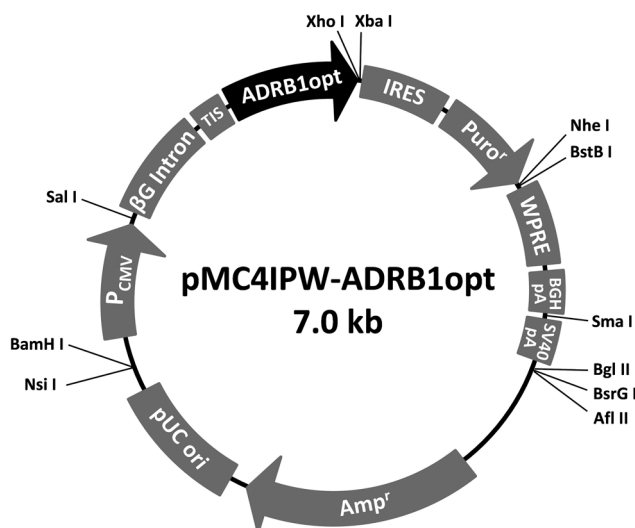


Рис. 1. Плазмидная конструкция рМС4IPW-ADRB1opt. PCMV — промотор ранних генов цитомегаловируса человека; β G Intron — интрон гена β -глобина кролика; TIS — участок инициации трансляции; ADRB1opt — оптимизированный ген β_1 -адренорецептора человека; IRES — участок внутреннего связывания рибосом вируса энцефаломиокардита; Puro^r — ген устойчивости к пурамицину; WPRE — посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита лесного сурка; BGH pA — сигнал полиаденилирования мРНК гена гормона роста быка; SV40 pA — сигнал полиаденилирования мРНК ранних генов вируса SV40; Amp^r — ген устойчивости к антибиотику ампициллину; pUC ori — участок инициации репликации плазмиды в бактериях *E. coli*

Синтетические гены рекомбинантных антител получали аналогичным образом. Последовательности тяжелых и легких цепей рекомбинантных антител составляли на основе опубликованных Хольтоффом и

соавт. аминокислотных последовательностей вариабельных доменов мышинового моноклонального антитела 23-6-7, направленного ко второй внеклеточной петле β_1 -адренорецептора человека [12]. К этим последовательностям присоединяли последовательности константных доменов иммуноглобулинов класса IgG1 мыши или человека с образованием, соответственно, мышинового рекомбинантного антитела mAB2367 и химерного (мышь/человек) рекомбинантного антитела hAB2367, обладающих специфичностью исходного моноклонального антитела. Оптимизированные гены тяжелых и легких цепей каждого антитела синтезировали (DNA2.0, США) и встраивали в двухкассетный вектор рDC, каждая кассета которого идентична экспрессионной кассете вектора рМС4IPW, за исключением того, что в одной из кассет ген устойчивости к пурамицину заменен на ген устойчивости к гирномицину В.

Последовательность нуклеотидов сАМР-зависимого промотора составляли из базального фрагмента промотора бета-глобина кролика и регуляторных элементов промоторов соматостатина, вазоактивного кишечинального пептида, цитомегаловируса и вируса бычьего лейкоза, как описано в работе Химмлера и соавт. [10]. ДНК промотора синтезировали и встраивали в вектор рС4W [4] вместо промотора цитомегаловируса. Затем в вектор встраивали ген лициферазы из плазмиды рGL3 (Promega, США) с образованием репортерной плазмиды рС6BGSW-GL3.

Рекомбинантные антитела. Клетки-продуценты рекомбинантных антител получали путем трансфекции клеток линии НЕК293 плазмидными конструкциями с генами тяжелых и легких цепей антител mAB2367 и hAB2367 в двухкассетном экспрессионном векторе рDC. Клоны-трансфектанты отбирали путем выращивания колоний на среде, содержащей одновременно два антибиотика: пурамицин (2 мкг/мл) и гирномицин В (200 мкг/мл), размножали и определяли продукцию иммуноглобулинов мыши или человека в кондиционированной среде методом ИФА. Для наработки антител клетки клонов, показавших наибольшую производительность, адаптировали к бессывороточной среде 293 SFM II (Life Technologies, США) и культивировали во флаконах с площадью поверхности 225 см² (Costar-Corning, США). Рекомбинантные антитела очищали из кондиционированной среды хроматографией на гидрофобном сорбенте Phenyl-650M и аффинном сорбенте AFRProtein A-650F (Toyopearl, Япония).

Радиолигандный анализ. Исходными компонентами для получения ¹²⁵I-цианопиндолола служили Na¹²⁵I

(2000 Ки/ммоль, ОАО «В/О «Изотоп», Россия) и цианопиндолол (Sigma-Aldrich, США). Введение радиоактивного йода в молекулу цианопиндолола осуществляли в лаборатории изотопных методов анализа Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (ИБХ) РАН методом Гринвуда и Хантера [9] с некоторыми модификациями, как описано ранее [1].

Для проведения анализа культивируемые клетки родительской линии 293-Н и клон-продуцента ADL7A снимали с поверхности флаконов обработкой трипсином, реакцию протеолиза останавливали добавлением культуральной среды с 10% FBS, клетки осаждали центрифугированием 15 мин. при 1100 об./мин. (200 g), дважды промывали PBS при комнатной температуре и суспендировали в растворе PBS с 0,1 мг/мл BSA (Sigma-Aldrich, США). Суспензии клеток смешивали с таким расчетом, чтобы концентрация клеток 293-Н составляла $5 \cdot 10^6$ кл./мл и в пробе для анализа объемом 100 мкл находилось дозированное число клеток ADL-7A. В пробу вносили 100 мкл клеточной суспензии, добавляли 100 мкл раствора ^{125}I -цианопиндолола с количеством радиоактивности 10^5 имп./мин. и инкубировали в течение 1 ч при 37°C с перемешиванием на шейкере. Процесс останавливали добавлением 400 мкл ледяной воды. Для отмывки от несвязавшейся радиоактивности клетки центрифугировали при 2000 g 10 мин., осадок трижды промывали суспендированием в 200 мкл холодного раствора PBS и центрифугированием при тех же условиях, после чего просчитывали на γ -счетчике «Wallac Wizard 1470» (PerkinElmer, США). Все измерения проводили в 3 параллелях. Расчет числа молекул лиганда, связавшихся с клетками, проводили, исходя из полученных значений радиоактивности, величины удельной радиоактивности ^{125}I -цианопиндолола и эффективности γ -счетчика (около 60%). Коэффициент пересчета составлял 226000 молекул лиганда на 1 имп./мин.

Индукция cAMP. Клетки ADL-7A трансфицировали смесью плазмидных ДНК pC6BGSW-GL3 и pMC4INW в пропорции 20:1. Присутствие плазмиды pMC4INW, несущей ген устойчивости к гигромицину В, обеспечивало возможность селекции клонов-трансфектантов на среде с гигромицином (200 мкг/мл). Для экспериментов по индукции cAMP был отобран клон BG-22, показавший 15-кратное увеличение синтеза люциферазы при стимуляции изопротеренолом (Sigma-Aldrich, США). Клетки BG-22 высевали в лунки 24-луночных планшетов по 50000 клеток на лунку. На следующий день среду в планшетах меняли на свежую со стимулятором: изопротеренолом или форсколином

(Sigma-Aldrich, США). Клетки инкубировали 24 ч, а затем лизировали и измеряли активность люциферазы при помощи набора «Luciferase Reporter Assay Kit» (BD Biosciences, США) и люцинометра LKB 1250 (Швеция). Активность люциферазы выражали в относительных световых единицах (RLU).

Фиксация клеток. Клетки ADL-7A высевали в лунки 96-луночных планшетов, предварительно покрытых поли-L-лизинном (30–70 кДа, Sigma-Aldrich, США), культивировали 24 ч, а затем фиксировали раствором 0,025%-ного глутарового альдегида (Sigma-Aldrich, США) в PBS в течение 15 мин. при комнатной температуре с перемешиванием на орбитальном шейкере. После фиксации планшеты промывали 4 раза раствором PBS и последовательно обрабатывали растворами 0,5 М этаноламина, pH 8,2 (ООО «Компонент-Реактив», Россия) и 10 мМ боргидрида натрия (Sigma-Aldrich, США) по 30 минут при комнатной температуре. Далее планшеты промывали 4 раза раствором PBS, инкубировали с консервирующим раствором 2%-ной сахарозы и 10 мг/мл BSA в PBS 1 ч, удаляли консервирующий раствор и сушили в течение 2 ч при 37°C .

ИФА в формате CELISA. Для проведения конкурентного ИФА в лунки планшетов вносили по 100 мкл разведений химерных антител hAB2367 в блокирующем растворе, содержащем 0,1% Tween 20 и 0,05% коллоид казеина (Stereospecific Detection Technologies, ФРГ) в PBS. Планшеты инкубировали 24 ч при 25°C с перемешиванием на орбитальном шейкере, затем промывали 4 раза раствором PBS с 0,1% Tween 20 и инкубировали с мышиными антителами mAB2367, разведенными в блокирующем растворе до концентрации 500 нг/мл, 30 мин. при 25°C с перемешиванием. После 4-кратной отмывки планшеты инкубировали с мечеными пероксидазой антителами козы к иммуноглобулинам мыши (разведение 1:2000) 1 ч при 25°C и промывали 4 раза раствором PBS с 0,1% Tween 20. Связывание антител проявляли с помощью субстрата пероксидазы 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) в буфере pH 5,2 в течение 15 мин. при 25°C в темноте с перемешиванием. Реакцию останавливали добавлением 10% серной кислоты, значения оптической плотности при 450 нм (OD_{450}) считывали при помощи микропланшетного ридера «Luminometer Photometer LMA01» (Beckman Coulter, США).

В экспериментах по тестированию экспрессии β_1 -адренорецептора в клетках клонов-трансфектантов и по определению константы скорости реакции (неконкурентный ИФА) инкубацию с химерными антителами не проводили. В отдельных случаях использовали ТМБ

в буфере с рН 6,8 с целью избежать слишком высоких оптических плотностей.

Результаты

Получение линии клеток с экспрессией рекомбинантного β_1 -адренорецептора человека. Плазмидой рМС4IPW-ADRB1opt (см. рис. 1), несущей оптимизированный ген β_1 -адренорецептора человека, трансфицировали клетки 293-Н (субклон линии НЕК293 клеток почки эмбриона человека). В предварительных экспериментах было показано, что эти клетки не экспрессируют природный β_1 -адренорецептор на уровне, доступном для ИФА-детекции. Клоны клеток-трансфектантов выращивали на селективной среде с пурамицином и определяли присутствие рекомбинантного β_1 -адренорецептора на поверхности клеток методом ИФА в формате CELISA с использованием рекомбинантных антител mAB2367, направленных ко второй внеклеточной петле β_1 -адренорецептора. По результатам тестирования для дальнейшей работы был отобран клон ADL-7A, показавший максимальный уровень сигнала в реакции с антителами.

Уровень представленности и стабильность экспрессии β_1 -адренорецептора. Содержание β_1 -адренорецептора в клетках ADL-7A определяли радиолигандным методом по связыванию ^{125}I -меченного цианопиндолола. Как показано на рисунке 2, связывание ^{125}I -цианопиндолола с родительскими клетками 293-Н, выполняющими функцию носителя, невелико (1), однако превышает уровень неспецифического связывания, наблюдаемый в присутствии подавляющего избытка (1,7 мкМ vs 0,18 нМ) немеченного цианопиндолола (3). По-видимому, это превышение объясняется способностью цианопиндолола как низкоселективного лиганда взаимодействовать не только с β -адренорецепторами всех трех типов, но и с другими клеточными рецепторами, в частности, серотониновыми [11, 14].

При добавлении в реакционную смесь 2000 клеток ADL-7A связывание ^{125}I -цианопиндолола возрастает на 22600 ± 1400 имп./мин. (2), что соответствует приблизительно $2,55 \cdot 10^6$ молекул лиганда в расчете на одну клетку ADL-7A. В условиях анализа концентрация ^{125}I -цианопиндолола (около 0,18 нМ) существенно превосходит константу его связывания с β_1 -адренорецептором (0,025–0,06 нМ, по данным разных авторов [8, 11]); поэтому число связавшихся молекул лиганда соответствует числу молекул рекомбинантного β_1 -адренорецептора, экспонированного на поверхности клеток.

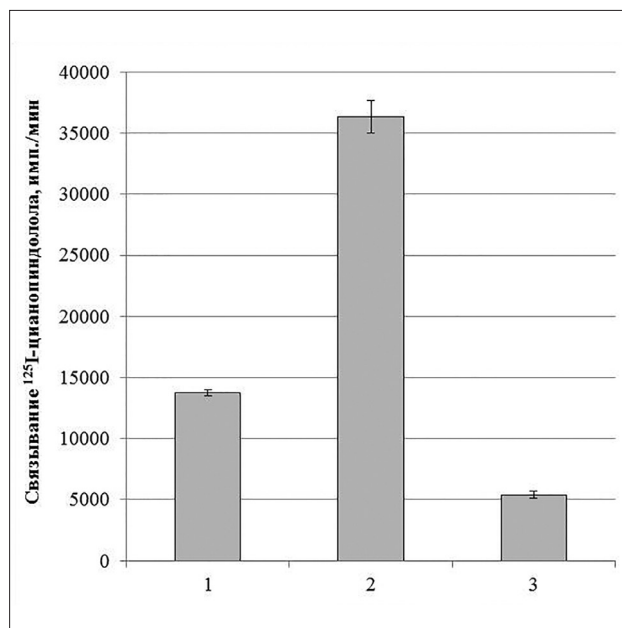


Рис. 2. Связывание ^{125}I -цианопиндолола с клетками родительской линии 293-Н и клона-трансфектанта ADL-7A. Полное количество радиоактивности в реакционной смеси — 92000 имп./мин., клетки 293-Н служат носителем для облегчения манипуляций с пробами во время анализа. Пробы содержат: 1 — 500000 клеток 293-Н; 2 — 500000 клеток 293-Н и 2000 клеток ADL-7A; 3 — 500000 клеток 293-Н, 10000 клеток ADL-7A и 1,7 мкМ немеченного цианопиндолола. Показаны средние значения и стандартные ошибки для измерений в трех параллелях

Перспектива использования клеток ADL-7A в диагностическом тесте подразумевает неизменность уровня экспрессии рекомбинантного β_1 -адренорецептора на протяжении длительного времени культивирования. Проверку стабильности экспрессии трансгена клетками ADL-7A проводили в течение 42 сут., пассируя клетки 2–3 раза в неделю с коэффициентом рассева 1:10. Периодически часть культуры отделяли и замораживали с сохранением жизнеспособности. По завершении полного срока наблюдения все собранные образцы размораживали и подвергали радиолигандному анализу. Результаты с очевидностью свидетельствуют (рис. 3), что экспрессия β_1 -адренорецептора в клетках ADL-7A не имеет тенденции к снижению, а ее колебания в процессе культивирования незначительны. В среднем содержание рекомбинантного β_1 -адренорецептора составляет $2,35 \pm 0,3 \cdot 10^6$ молекул на клетку.

Индукция cAMP. О функциональной активности рекомбинантного β_1 -адренорецептора судили по способности рецептора опосредовать передачу сигнала, вызывающего повышение внутриклеточного уровня

cAMP, при воздействии специфического бета-адрено-стимулятора изопротеренола. Для этого использовали стабильный клон-трансфектант BG-22, полученный из клеток ADL-7A, несущий ген люциферазы под контролем cAMP-зависимого промотора.

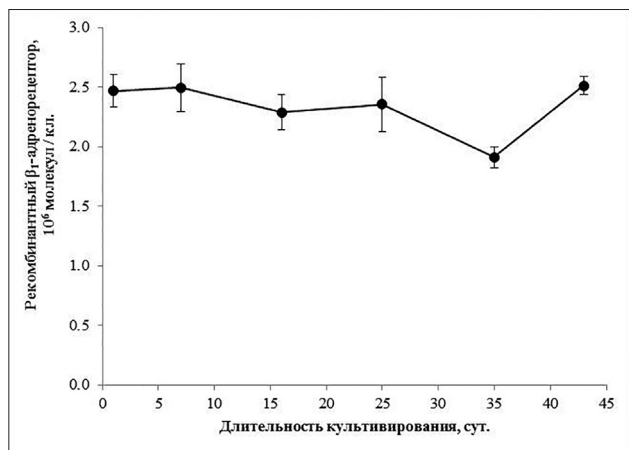


Рис. 3. Стабильность экспрессии рекомбинантного β_1 -адренорецептора клетками ADL 7A в течение 42 сут. культивирования. Содержание β_1 -адренорецептора в образцах клеток, отобранных на разных стадиях культивирования, определяли методом радиолигандного анализа с ^{125}I -цианопиндололом (1800 клеток ADL-7A на пробу) и выражали в количестве молекул на клетку

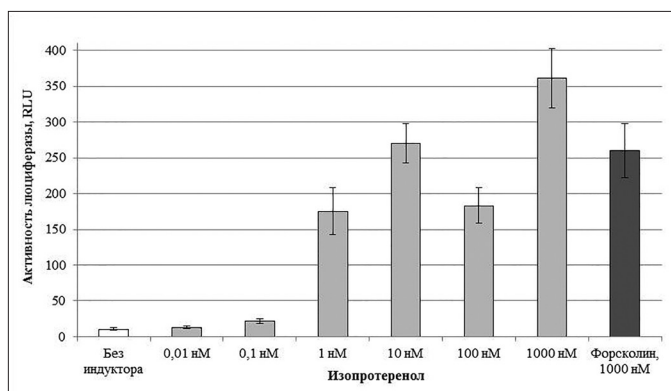


Рис. 4. Индукция cAMP. Клетки BG-22 трансфицированы плазмидой pC6BGSW-GL3 с геном люциферазы под контролем cAMP-зависимого промотора. Инкубация с индуктором 24 ч, измерение активности люциферазы в клеточных экстрактах. Показаны средние значения и стандартные отклонения для измерений в 6 параллелях

Клетки BG-22 инкубировали в присутствии изопротеренола или неспецифического стимулятора cAMP форсколина, после чего измеряли активность люциферазы в клеточном экстракте. Результаты (рис. 4) демонстрируют дозо-зависимый эффект индукции cAMP под воздействием изопротеренола, сравнимый с эффектом

форсколина. Стимулирующий эффект изопротеренола заметен, начиная с концентрации 0,1 нМ, что свидетельствует о полной функциональности рекомбинантного β_1 -адренорецептора в клетках ADL-7A.

Оптимизация условий фиксации клеток. В ходе работы по созданию метода иммуноферментного анализа с использованием клеток, экспрессирующих β_1 -адренорецептор, в качестве твердофазного носителя (формат CELISA), необходимо было подобрать условия иммобилизации клеток на поверхности лунок культурального планшета, сохраняющие нативную структуру антигена. Как оказалось, фиксация клеток формальдегидом в стандартных условиях приводит к значительному изменению антигенных свойств β_1 -адренорецептора. Фиксация глутаровым альдегидом в целом дает более удовлетворительные результаты, однако требует оптимизации условий и параметров. Нам удалось частично нейтрализовать негативное воздействие альдегидов на антигенную структуру применением этаноламина, блокирующего активные альдегидные группы, а также боргидрида натрия, способного восстанавливать активные шиффовы основания (данные не представлены).

На рисунке 5 показана зависимость степени сохранности антигена и эффективности иммобилизации клеток от концентрации глутарового альдегида. Количество иммобилизованных клеток оценивали по окрашиванию фиолетовым кристаллическим (OD_{590}), проводимым вслед за ИФА, причем за 100% эффективности иммобилизации принимали величину окрашивания при заведомо высокой концентрации фиксатора 0,16%. Степень сохранности антигена определяли как отношение сигнала антител (OD_{450}) к уровню окрашивания фиолетовым кристаллическим, принимая за 100% значение, полученное в отсутствие фиксирующего агента. Можно видеть, что при увеличении концентрации фиксатора эффективность иммобилизации растет, а сохранность антигена, наоборот, снижается, однако в определенном довольно узком диапазоне концентраций от 0,02 до 0,03% оба параметра остаются на приемлемом уровне выше 60%. Исходя из этих данных, мы выбрали концентрацию глутарового альдегида 0,025% в качестве оптимальной для фиксации клеток.

Оптимизация условий конкурентного ИФА.

На сегодняшний день ни масштаб абсолютных концентраций аутоантител к β_1 -адренорецептору в сыворотке крови пациентов, ни диапазон соответствующих констант связывания неизвестны. Поэтому мы отработывали условия конкурентного ИФА на модельной системе с использованием мышиных антител mAB2367 в каче-

стве антител-конкурентов и химерных рекомбинантных антител hAB2367, имитирующих человеческие ауто-антитела. Варибельные домены hAB2367 идентичны варибельным доменам мышинового антитела mAB2367, а константная часть представляет собой C-домены тяжелой и легкой цепей человеческих иммуноглобулинов класса IgG1. Константу скорости реакции связывания измеряли, варьируя концентрацию антител при фиксированном времени инкубации (рис. 6). По полученной кривой определяли константу скорости прямой реакции k и величину, ей обратную: $k^{-1} = 590 \pm 70$ (нг/мл)·ч.

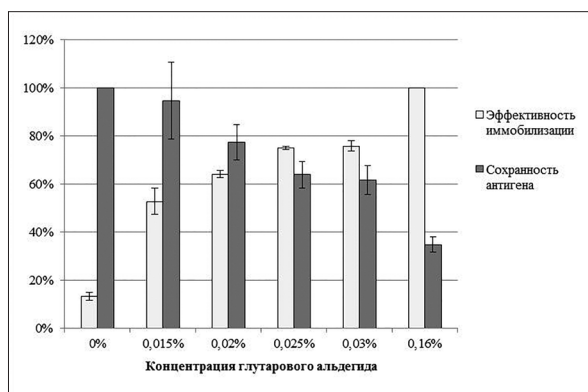


Рис. 5. Зависимость эффективности иммобилизации клеток и сохранности антигенной структуры β_1 -адренорецептора от концентрации глутарового альдегида. Показаны средние значения и стандартные ошибки по результатам трех независимых экспериментов

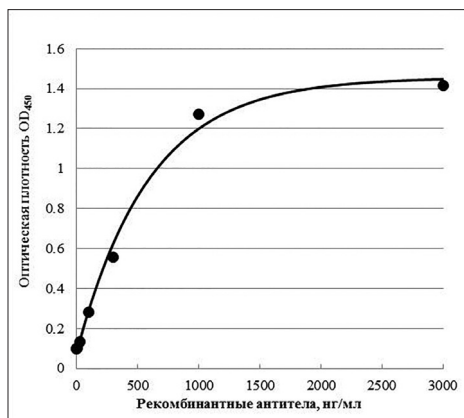


Рис. 6. Определение константы скорости реакции связывания. Результаты ИФА с 3500 фиксированных клеток ADL-7A, инкубация с антителами mAB2367 в течение 1 ч, реакция с субстратом ТМБ при pH 6,8

Инкубацию с человеческими антителами оптимально проводить в течение суток: более длительные сроки нецелесообразны для рутинных анализов. Расчет показывает, что если пренебречь обратной реакцией, то в этих условиях около половины антигена окажется

связанной с модельными антителами при их концентрации порядка 20 нг/мл. Концентрацию антигена в реакционной смеси нетрудно вычислить, зная содержание рекомбинантного β_1 -адренорецептора в клетках ADL-7A. Для пробы объемом 100 мкл, где находится 1000 иммобилизованных клеток, концентрация антигена составляет приблизительно 0,04 нМ и эквивалентна концентрации антител 6 нг/мл. Таким образом, данный формат анализа удовлетворяет требованию избытка антител над антигеном. Подобный расчет позволяет также оценить ориентировочный диапазон измерения концентраций человеческих антител методом конкурентного ИФА: 10–40 нг/мл.

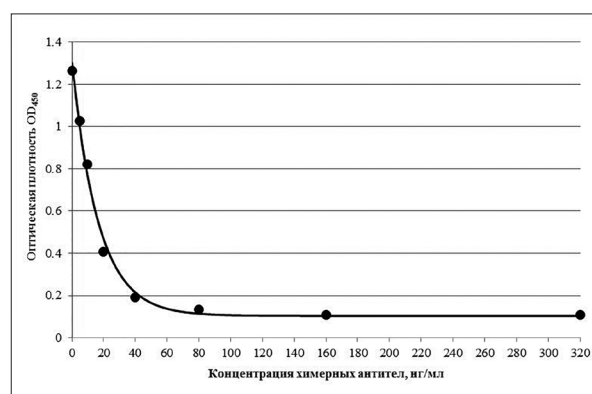


Рис. 7. Конкурентный ИФА, модельный эксперимент. В лунке планшета находится 1000 клеток ADL-7A. Последовательная инкубация 24 ч с химерными антителами hAB2367 и 30 мин. с мышинными антителами mAB2367 (500 нг/мл)

Результаты типичного эксперимента на модельной системе представлены на рисунке 7. Химерные антитела hAB2367 препятствуют последующему связыванию мышинных антител при концентрациях выше 5 нг/мл, а максимальная степень ингибирования, близкая к 100%, достигается при их концентрации около 50 нг/мл.

Обсуждение

Методы определения аутоантител к β_1 -адренорецептору на основе пептидного ИФА обладают недостаточными показателями специфичности и чувствительности, чтобы служить надежным средством диагностики аутоиммунного генеза сердечно-сосудистых патологий. «Золотым стандартом» считаются функциональные методы, однако они требуют оперирования с живыми культурами клеток млекопитающих или насекомых и по этой причине неприменимы в рутинной практике клинических анализов. Адекватным решением

проблемы могут стать иммунологические методы анализа с использованием трансгенных клеток, несущих на своей поверхности рекомбинантный β_1 -адренорецептор, в качестве источника антигена в природной конформации. Непосредственная реализация такого подхода осложняется высоким уровнем фона из-за неспецифического связывания иммуноглобулинов человека с поверхностью клеток. Борнхольц и соавт. [5] удалось преодолеть это затруднение и разработать метод цитофлуориметрического анализа на культуре клеток НТ1080, экспрессирующих β_1 -адренорецептор с присоединенным к нему желтым флуоресцентным белком. Достигнутая в работе эффективность определения аутоантител оказалась сравнимой с эффективностью функциональных методов. К сожалению, данный метод также не подходит для широкомасштабного применения, поскольку процедуры анализа необходимо выполнять на живых культивируемых клетках.

Чтобы обойти трудности, связанные с высоким уровнем фона, Хольтофф и соавт. [13] предложили метод конкурентного ИФА, в котором в качестве антител-конкурентов выступают полученные авторами мышинные моноклональные антитела, направленные ко второй внеклеточной петле β_1 -адренорецептора. Разумеется, при таком подходе возможна детекция только тех аутоантител, эпитопы которых также располагаются на участке второй внеклеточной петли β_1 -адренорецептора или рядом с ней. Впрочем, как показано во многих работах, большинство аутоантител-агонистов реагирует именно со второй петлей [5, 13, 20, 24]. Результаты Хольтоффа и соавт. свидетельствуют о достаточно высокой эффективности метода: аутоантитела к β_1 -адренорецептору выявлены у 62% больных ДКМП в сравнении с 8% в группе соответствующих по возрасту здоровых доноров.

В методе Хольтоффа экспрессия β_1 -адренорецептора достигается транзитным заражением культуры клеток насекомых бакуловирусом, что значительно усложняет проведение анализа. В нашей работе для решения той же задачи создана трансгенная клеточная линия ADL-7A на основе клеток почки эмбриона человека HEK293. Стабильность экспрессии рекомбинантного β_1 -адренорецептора в клетках ADL-7A проверена на протяжении 42-суточного периода наблюдения (около 50 генераций): колебания уровня β_1 -адренорецептора не превышают 15%. При этом эффективность экспрессии сравнима с результатами Борнхольц и соавт.: $2-3 \cdot 10^6$ молекул на клетку [5].

Экспрессируемый клетками ADL-7A β_1 -адренорецептор обладает функциональной активностью,

как следует из экспериментов по индукции внутриклеточного cAMP под действием изопротеренола. Способность связывать лиганд и правильно передавать сигнал говорит в пользу того, что рекомбинантный β_1 -адренорецептор находится в природной конформации и может реагировать с аутоантителами-агонистами. Фиксация клеток нарушает эту способность, однако мы показали, что можно избежать значительного повреждения антигенной структуры рецептора за счет использования минимальных концентраций фиксирующего агента и применения ряда дополнительных обработок.

Оптимизация условий и параметров конкурентного ИФА, проведенная на модельной системе с химерными антителами, дала возможность оценить чувствительность метода. Разработанная технология позволяет наблюдать эффект конкуренции, начиная с концентрации химерных антител 5 нг/мл. Данную величину следует рассматривать как ориентировочную, так как константы скорости и равновесия, задающие порог чувствительности метода, у природных аутоантител могут варьировать в широком диапазоне, заведомо отличаясь от соответствующих констант модельных антител.

Заключение

Разработанный нами метод с использованием клеток ADL-7A будет в дальнейшем применен для исследования связи между уровнем аутоантител к β_1 -адренорецептору и нарушениями ритма и проводимости сердца у различных категорий больных.

Настоящая работа выполнена в рамках проекта «Разработка диагностического набора, основанного на принципе конкурентного иммуноферментного анализа, для определения уровня аутоантител к β_1 -адренорецептору у больных с идиопатическими нарушениями ритма и проводимости сердца и при наличии сердечно-сосудистой патологии», финансируемого по Соглашению № 14.604.21.0068 от 27.06.2014 ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2014–2020 гг.», уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60414X0068.

Литература

1. Агапова О.Ю., Скоблов Ю.С., Зыков К.А., Рвачева А.В., Бейлина В.Б., Масенко В.П., Чазова И.Е. Радиолигандный метод оценки рецепторной активности

- β -адренорецепторов Т-лимфоцитов человека // Биорганическая химия. — 2015. — Т. 41. — С. 592–598.
2. Афанасьева О.И., Клесарева Е.А., Ефремов Е.Е., Сидорова М.В., Беспалова Ж.Д., Левашов П.А., Ежов М.В., Адамова И.Ю., Покровский С.Н. Иммуноферментный метод на основе химерной молекулы и олигопептидных фрагментов для определения аутоантител к β_1 -адренорецептору у больных дилатационной кардиомиопатией // Клиническая лабораторная диагностика. — 2013. — № 4. — С. 24–27.
 3. Гупало Е.М., Стукалова О.В., Рогова М.М., Мироннова Н.А., Малкина Т.А., Шарф Т.В., Ефремов Е.Е., Герасимова В.В., Бакалов С.А., Терновой С.К., Голицын С.П. Взаимосвязь очагового фиброза миокарда по данным магнитно-резонансной томографии, аутоантител к рецепторам кардиомиоцитов и желудочковых нарушений ритма у больных дилатационной кардиомиопатией // Кардиология. — 2014. — Т. 54(12). — С. 29–36.
 4. Шевелев А.Я. Экспрессионный вектор для синтеза белков в клетках млекопитающих. 2009; патент на изобретение RU 2364627C2.
 5. Bornholz B., Benninghaus T., Reinke Y., Felix S.B., Roggenbuck D., Jahns-Boivin V., Jahns R., Boege F. A standardised FACS assay based on native, receptor transfected cells for the clinical diagnosis and monitoring of β_1 -adrenergic receptor autoantibodies in human heart disease // Clin. Chem. Lab. Med. — 2016. — Vol. 54. — P. 683–691.
 6. Bornholz B., Roggenbuck D., Jahns R., Boege F. Diagnostic and therapeutic aspects of β_1 -adrenergic receptor autoantibodies in human heart disease // Autoimmun. Rev. — 2014. — Vol. 13. — P. 954–962.
 7. Chiale P.A., Rosenbaum M.B., Elizari M.V., Hjalmarsen A., Magnusson Y., Wallukat G., Hoebeke J. High prevalence of antibodies against β_1 - and β_2 -adrenoceptors in patients with primary electrical cardiac abnormalities // J. Am. Coll. Cardiol. — 1995. — Vol. 26. — P. 864–869.
 8. Flesch M., Eitelbrück S., Rosenkranz S., Maack C., Cremers B., Schlüter K.D., Zolk O., Böhm M. Differential effects of carvedilol and metoprolol on isoprenaline-induced changes in β -adrenoceptor density and systolic function in rat cardiac myocytes // Cardiovasc. Res. — 2001. — Vol. 49. — P. 371–380.
 9. Greenwood F.C., Hunter W.M. The preparation of labelled human growth hormone of high specific radioactivity // Biochem. J. — 1963. — Vol. 89. — P. 114–123.
 10. Himmler A., Stratowa C., Czernilofsky A.P. Functional testing of human dopamine D1 and D5 receptors expressed in stable cAMP-responsive luciferase reporter cell lines // J. Recept. Res. — 1993. — Vol. 13. — P. 79–94.
 11. Hoffmann C., Leitz M.R., Oberdorf-Maass S., Lohse M.J., Klotz K.N. Comparative pharmacology of human β_1 - and β_2 -adrenergic receptor subtypes — characterization of stably transfected receptors in CHO cells // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. — 2004. — Vol. 369. — P. 151–159.
 12. Holthoff H.P., Ungerer M., Zeibig S., Lohse M.J., Jahns R., Jahns V. Binding compounds to human β_1 -adrenoreceptor (β_1 -AR) and their use in the measurement of auto-anti- β_1 -AR antibodies. European Patent Application 2013; WO 2012168344 A1.
 13. Holthoff H.P., Zeibig S., Jahns-Boivin V., Bauer J., Lohse M.J., Käb S., Clauss S., Jahns R., Schlipp A., Münch G., Ungerer M. Detection of anti β_1 -AR autoantibodies in heart failure by a cell-based competition ELISA // Circ. Res. — 2012. — Vol. 111. — P. 675–684.
 14. Hoyer D., Engel G., Kalkman H.O. Molecular pharmacology of 5-HT₁ and 5-HT₂ recognition sites in rat and pig brain membranes: radioligand binding studies with [³H]5-HT, [³H]8-OH-DPAT, (-)[¹²⁵I]iodocyanopindolol, [³H]mesulergine and [³H]ketanserin // Eur. J. Pharmacol. — 1985. — Vol. 118. — P. 13–23.
 15. Jahns R., Boivin V., Lohse M.J. Beta 1-adrenergic receptor directed autoimmunity as a cause of dilated cardiomyopathy in rats // Int. J. Cardiol. — 2006. — Vol. 112. — P. 7–14.
 16. Jahns R., Boivin V., Siegmund C., Inselmann G., Lohse M.J., Boege F. Autoantibodies activating human β_1 -adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure // Circulation. — 1999. — Vol. 99. — P. 649–654.
 17. Jane-wit D., Alfuntas C.Z., Johnson J.M., Yong S., Wickley P.J., Wang C., Popovic Z.B., Damson D.S., Perez D.M., Tuohy V.K. Beta1-adrenergic receptor autoantibodies mediate dilated cardiomyopathy by agonistically inducing cardiomyocyte apoptosis // Circulation. — 2007. — Vol. 116. — P. 399–410.
 18. Magnusson Y., Wallukat G., Waagstein F., Hjalmarsen A., Hoebeke J. Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy characterization of antibodies against the β_1 -adrenoceptor with positive chronotropic effect // Circulation. — 1994. — Vol. 89. — P. 2760–2767.
 19. Matsui S., Fu M.L., Shimizu M., Fukuoka T., Teraoka K., Takekoshi N., Murakami E., Hjalmarsen A. Dilated cardiomyopathy defines serum autoantibodies against G-protein coupled cardiovascular receptors // Autoimmunity. — 1995. — Vol. 21. — P. 85–88.
 20. Nikolaev V.O., Boivin V., Störk S., Angermann C.E., Ertl G., Lohse M.J., Jahns R. A novel fluorescence method for the rapid detection of functional beta1-adrenergic receptor autoantibodies in heart failure // J. Am. Coll. Cardiol. — 2007. — Vol. 50. — P. 423–431.
 21. Störk S., Boivin V., Horf R., Hein L., Lohse M.J., Angermann C.E., Jahns R. Stimulating autoantibodies directed against the cardiac beta1-adrenergic receptor predict increased mortality in idiopathic cardiomyopathy // Am. Heart J. — 2006. — Vol. 152. — P. 697–704.
 22. Versteeg H.H., Nijhuis E., van den Brink G.R., Evertzen M., Pynaert G.N., van Deventer S.J.H., Coffers P.J., Peppelenbosch M.P. A new phosphospecific cell-based ELISA for p42/

- p44 mitogen-activated protein kinase (МАРК), p38 МАРК, protein kinase B and cAMP-response-element-binding protein // *Biochem. J.* – 2000. – Vol. 350. – P. 717–722.
23. Wallukat G., Schimke I. Agonistic autoantibodies directed against G-protein-coupled receptors and their relationship to cardiovascular diseases // *Semin. Immunopathol.* – 2014. – Vol. 36. – P. 351–363.
24. Wallukat G., Wollenberger A., Morwinski R., Pitschner H.F. Anti- β_1 -adrenoceptor autoantibodies with chronotropic activity from the serum of patients with dilated cardiomyopathy: mapping of epitopes in the first and second extracellular loops // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1995. – Vol. 27. – P. 397–406.
25. Zuo L., Du Y., Ma J., Wang K., Zhao Y., Bai F., Wu B., Ma X., Liu H. Pro-arrhythmic action of autoantibodies against the second extracellular loop of β_1 -adrenoceptor and its underlying molecular mechanisms // *Int. J. Cardiol.* – 2015. – Vol. 198. – P. 251–258.

Список сокращений:

- сАМР – циклический аденозинмонофосфат;
 ДКМП – дилатационная кардиомиопатия;
 ИФА – иммуноферментный анализ;
 CELISA – иммуноферментный анализ на клетках (cellular enzyme-linked immunosorbent assay);
 PBS – фосфатно-солевой буфер;
 BSA – бычий сывороточный альбумин;
 RLU – относительные световые единицы;
 ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин;
 FBS – фетальная бычья сыворотка.

CELL LINE EXPRESSING RECOMBINANT β_1 -ADRENERGIC RECEPTOR FOR THE AGONISTIC AUTOANTIBODIES DETECTION BY A COMPETITIVE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

A.Y. SHEVELEV^{1,3}, N.M. KASHIRINA¹, T.B. KUZNETSOVA¹, T.V. SHARF¹,
 E.N. MAMOCHKINA¹, O.Y. AGAPOVA², T.Kh. GURSKAYA¹, L.N. LIPATOVA^{1,3},
 M.M. PEKLO^{1,3}, P.N. RUTKEVICH^{1,3}, E.V. YANUSHEVSKAYA¹, I.N. RYBALKIN^{1,3},
 Y.S. SKOBLOV⁴, E.E. EFREMOV¹, T.N. VLASIK^{1,3}, K.A. ZYKOV^{1,2}

¹Russian Cardiology Research and Production Complex, Institute of Experimental Cardiology; ²Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Laboratory of Pulmonology; ³MonA, Limited Liability Company;
⁴M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the RAS, Moscow, Russia

Stable human cell line expressing recombinant β_1 -adrenergic receptor was generated by plasmid-transfection technique. Recombinant receptor is fully functional as shown by cAMP induction experiments. Conditions for 0.025%-glutaraldehyde cell fixation followed by ethanolamine and sodium borohydride treatment was established, preserving the structure of antigen. Parameters for competitive cellular enzyme-linked immunosorbent assay were optimized for anti- β_1 -adrenergic receptor agonistic autoantibodies detection using mouse recombinant antibodies-competitors directed to the β_1 -adrenergic receptor second extracellular loop. On the model system with chimeric recombinant antibodies of the same specificity, which mimic the human autoantibodies, the ability to measure agonistic autoantibodies concentration was demonstrated in the range of 5 to 50 ng/mL.

Keywords: β_1 -adrenergic receptor, agonistic autoantibodies, cell transfection, competitive enzyme-linked immunosorbent assay, recombinant antibodies.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК, ГРАНУЛОМЕТРИЧЕСКОГО СОСТАВА И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ КОНСТРУКЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ АНАЛОГ ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА

О.С. ИВАНОВА^{1*}, А.А. ЛОМЗОВ², Г.М. ЛЕВАГИНА¹, А.В. БАТЕНЕВА¹, Л.Н. ШИШКИНА¹, М.О. СКАРНОВИЧ¹, М.А. СКАРНОВИЧ¹, [В.И. МАСЫЧЕВА¹], Е.Д. ДАНИЛЕНКО¹

¹ ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Бердск;

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Проведено исследование гранулометрического состава, структурных характеристик и биологических свойств молекулярной конструкции, содержащей двуспиральную РНК в оболочке из молекул конъюгата декстрана с дельтафероном (аналог интерферона-гамма) и спермидина. Методами УФ- и КД-спектроскопии показано отсутствие значительных конформационных перестроек в структуре компонентов конструкции и их идентичность исходным молекулам дельтаферона и дсРНК. Анализ гранулометрического состава показал наличие в образцах молекулярной конструкции однородных по размеру сферических частиц с размерами порядка 200 нм, обладающих противовирусной и интерферон-индуцирующей активностью.

Ключевые слова: молекулярная конструкция, спектральные характеристики, гранулометрический состав, противовирусная активность, интерферон-индуцирующая активность.

Введение

Разработка систем доставки лекарственных веществ в патологический очаг является бурно развивающимся направлением современной биотехнологии и позволяет решать ряд проблем, связанных с их применением. Системы адресной доставки дают возможность повышать растворимость гидрофобных компонентов лекарств, увеличивать проницаемость для активных компонентов клеточных мембран и гистогематических барьеров, усиливать их накопление в клетках и тканях, что важно для снижения эффективной дозы лекарственного вещества и ослабления его побочных эффектов.

Исследование физико-химических и структурных характеристик препаратов является обязательным компонентом при разработке наноразмерных лекарственных средств. Размер частиц (гранулометрический состав) активных ингредиентов — чрезвычайно важная физическая

характеристика материалов, используемых для создания лекарственных препаратов заданного качества. Размер частиц может оказывать непосредственное влияние на характеристики конечного продукта и стабильность состава препарата. Значительную ценность представляют и сведения о межмолекулярном взаимодействии, сохранении структуры активных компонентов лекарственных средств.

Ранее в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ГНЦ ВБ «Вектор») была разработана двухслойная молекулярная конструкция, содержащая в центральной части двуспиральную дрожжевую РНК (дсРНК), покрытую оболочкой из молекул декстрана, конъюгированных с молекулами цитокинов (фактор некроза опухоли альфа, интерферон-гамма) и спермидина [4, 5]. Достоинством конструкции является ее биodeградируемость, что исключает негативные эффекты, связанные с кумуляцией частиц либо их компонентов. Наличие в структуре, помимо цитокина, модулятора иммунного ответа дсРНК, обеспечивает возможность синергидного эффекта компонентов. Электронно-микроскопические исследования конструкции, несущей противовирусный белок, рекомбинантный аналог интерферона-гамма человека дельтаферон, подтвердили наличие в образцах частиц сферической формы размерами 200–400 нм [2].

© 2015 г. Иванова О.С., Ломзов А.А., Левагина Г.М., Батенева А.В., Шишкина Л.Н., Скарнович М.О., Скарнович М.А., [Масычева В.И.], Даниленко Е.Д.

* Автор для переписки:

Иванова Ольга Сергеевна
научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Бердск
E-mail: ivanova_os@vector.nsc.ru

Цель настоящей работы состояла в изучении гранулометрического состава препарата молекулярной конструкции, несущей дельтаферон, сохранности вторичной структуры и биологических свойств белкового и нуклеинового компонентов в составе конструкции.

Материалы и методы

В работе использовали аналог рекомбинантного человеческого интерферона-гамма дельтаферон с концентрацией белка 0,45 мг/мл и удельной специфической активностью $5,3 \times 10^5$ МЕ/мг (ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», г. Бердск), дрожжевую двуспиральную РНК с концентрацией основного вещества 0,106 мг/мл (ООО «Диафарм», г. Бердск), спермидин («Sigma», США), декстран 40000 Да («Sigma», США). Сборку молекулярной конструкции осуществляли в соответствии с методом, описанным в патенте [5]. Жидкую форму молекулярной конструкции лиофилизировали с помощью лиофильной сушки «FreeZone» в автоматическом режиме с опцией пневматической укупорки (FreeZone, США). Полученные образцы молекулярной конструкции хранились в течение года при температуре $+2 - +8$ °С.

Спектры поглощения образцов в ультрафиолетовой области (УФ-спектры) исследовали с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-2100 (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн 190–350 нм с разрешением 0,1 нм, шириной щели 1 нм. Для измерений применяли кварцевую кювету с длиной оптического пути 1 см и объемом 1 мл. В качестве контроля использовали спектры исходных компонентов дсРНК и белка дельтаферона.

Спектры кругового дихроизма (КД-спектры) были записаны с использованием спектрополяриметра Jasco J-600 (Jasco, Япония). Исследование оптической активности образцов проводили в диапазоне длин волн 190–350 нм с разрешением 0,1 нм, шириной щели 1 нм, скоростью сканирования 20 нм/мин. и чувствительностью 50 мград. Измерение проводили в кювете с длиной оптического пути 1 см и объемом 800 мкл.

Анализ гранулометрического состава образцов молекулярной конструкции в лиофилизированном и жидком состоянии осуществляли на анализаторе Z-потенциала Zeta Plus (Brookhaven, Австрия). Лиофилизированный образец растворяли в воде для инъекций до концентрации, эквивалентной концентрации жидкого образца конструкции. Измерение проводили в условиях термостатирования при 25 °С. Анализ каждого образца проводили три раза, усредняя величину измерения.

Оценку противовирусной активности образцов молекулярной конструкции осуществляли на перевиваемой культуре клеток MDCK. Вирус гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) в виде вирус-аллантаиновой жидкости с концентрацией $8,5 \lg TCD_{50}$ /мл наносили в десятикратных разведениях на клеточный монослой, инкубировали в течение часа при комнатной температуре для адсорбции вируса, после чего в лунки вносили препарат молекулярной конструкции, содержащей дельтаферон, либо препарат сравнения дельтаферон в концентрации 334 и 667 МЕ/мл. Клетки инкубировали в течение 3 суток при температуре $+37$ °С в атмосфере 5% CO_2 . По окончании культивирования с помощью инвертированного микроскопа регистрировали цитопатическое действие в монослое клеток и определяли наличие вируса в среде культивирования по реакции гемагглютинации с 1% эритроцитами кур.

Оценку интерферон-индуцирующей активности молекулярной конструкции проводили на белых беспородных мышах, которым вводили препарат однократно внутрибрюшинно в дозе 500 тыс. МЕ (по белку). Содержание интерферона-альфа (ИФН-альфа) определяли в образцах крови, взятых через 3 и 24 часа после введения иммуноферментным методом с помощью набора Mouse Interferon Alpha (Mu-IFN- α) ELISA Kit (PBL Biomedical Laboratories).

Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли стандартными методами с помощью пакета компьютерных программ «Statistica 6,0» (StatSoft Inc. 1984–2001), «Statgraphics, Vers.5.0» (Statistical Graphics Corp., USA). Достоверность обнаруженных межгрупповых различий оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Ранее при обработке метода сборки конструкции, содержащей дельтаферон, нами было выбрано количественное соотношение двуспиральной РНК и дельтаферона в составе реакционной смеси 1:5 (по массе, соответственно), при котором формировались наночастицы с размерами 200–400 нм, сохранявшие специфическую противовирусную активность ($0,5 \times 10^5$ МЕ/мг) [2].

В настоящей работе приведены результаты исследования гранулометрического состава образцов молекулярной конструкции, содержащей дельтаферон, с указанным выше соотношением компонентов, хранившихся в лиофилизированном и жидком состоянии.

Анализ жидкого образца молекулярной конструкции методом динамического светорассеяния показал, что в препарате присутствуют как частицы размером около 300 нм — 83,9%, так и сравнительно небольшие частицы диаметром 10–30 нм — 16,1% (рис.1).

При анализе лиофилизированного образца конструкции после восстановления до раствора основной сигнал соответствовал частицам размером 200 нм —

94,8%, доля сравнительно небольших частиц (около 20 нм) составляла 5,2% (рис. 2). То есть, лиофильно высушенные образцы отличались большей однородностью размерных характеристик по сравнению с образцами в растворе. Вероятно, хранение препарата в жидком состоянии приводит к агрегации частиц, чего не наблюдается в лиофилизате, частицы которого отличаются большей стабильностью.

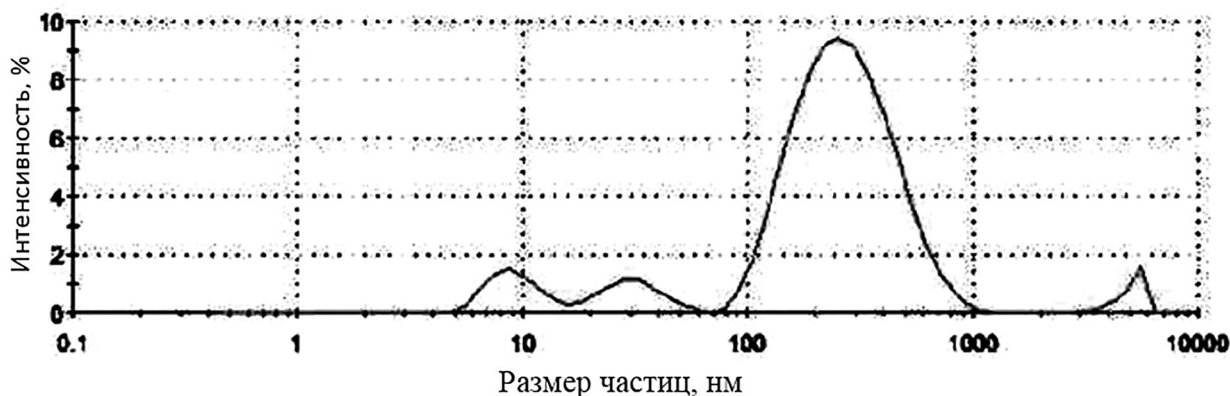


Рис. 1. График распределения частиц по размерам, рассчитанный усреднением 3 измерений для образца молекулярной конструкции в жидком состоянии



Рис. 2. График распределения частиц по размерам, рассчитанный усреднением 3 измерений для образца молекулярной конструкции в лиофилизированном состоянии

Сохранение структуры компонентов в составе препаратов является важным условием сохранности их биологических свойств. Особенно это актуально для белков в составе многокомпонентных биофармацевтических композиций. Под влиянием физических или химических воздействий белки нередко быстро теряют нативность. Как правило, это приводит к изменению третичной и частично — вторичной структуры молекулы и не сопровождается какими-либо изменениями первичной структуры. Изменение уникальной структуры нативного белка сопровождается потерей характерных для него свойств: растворимости, биологической активности, электрофоретической подвижности [8]. Сохра-

нение вторичной структуры важно и для реализации биологических свойств полинуклеотидов. Известно, например, что биологическая активность двуспиральных РНК определяется не первичной структурой полинуклеотидных нитей, то есть составом и последовательностью нуклеотидов, а образуемой полинуклеотидами вторичной структурой [6].

В связи с этим представлялось целесообразным провести исследование молекулярной конструкции в сравнении с ее компонентами методами ультрафиолетовой спектроскопии (УФ-спектроскопии) и кругового дихроизма (КД) и оценить влияние сборки конструкции на вторичную структуру дельтаферона и дсРНК. В ходе

анализа в каждом опыте проводилась параллельная запись спектров индивидуальных препаратов, а также модельной смеси компонентов молекулярной конструкции, рассчитанной теоретически, то есть содержащей эквивалентные количества дсРНК и дельтаферона, в сравнении со спектрами экспериментальных образцов молекулярной конструкции.

Исследование методом УФ-спектроскопии показало, что образец дсРНК имеет УФ-спектр с максимумом поглощения 260 нм, характерный для ну-

клеиновых кислот, дельтаферон — характерный спектр белков с максимумами при 205 и 280 нм. УФ-спектр молекулярной конструкции, содержащей дельтаферон, представлял собой аддитивную сумму спектров дельтаферона и дсРНК с незначительными отличиями, которые могут быть связаны с погрешностью метода (рис. 3). Полученные данные согласуются с результатами ранее проведенных исследований [3] и свидетельствуют о сохранности структуры дсРНК и белка в составе молекулярной конструкции.



Рис. 3. УФ-спектры молекулярной конструкции и ее компонентов (дельтаферон, дсРНК).

1 — спектр смеси компонентов молекулярной конструкции, 2 — дельтаферон,
3 — молекулярная конструкция, 4 — дсРНК

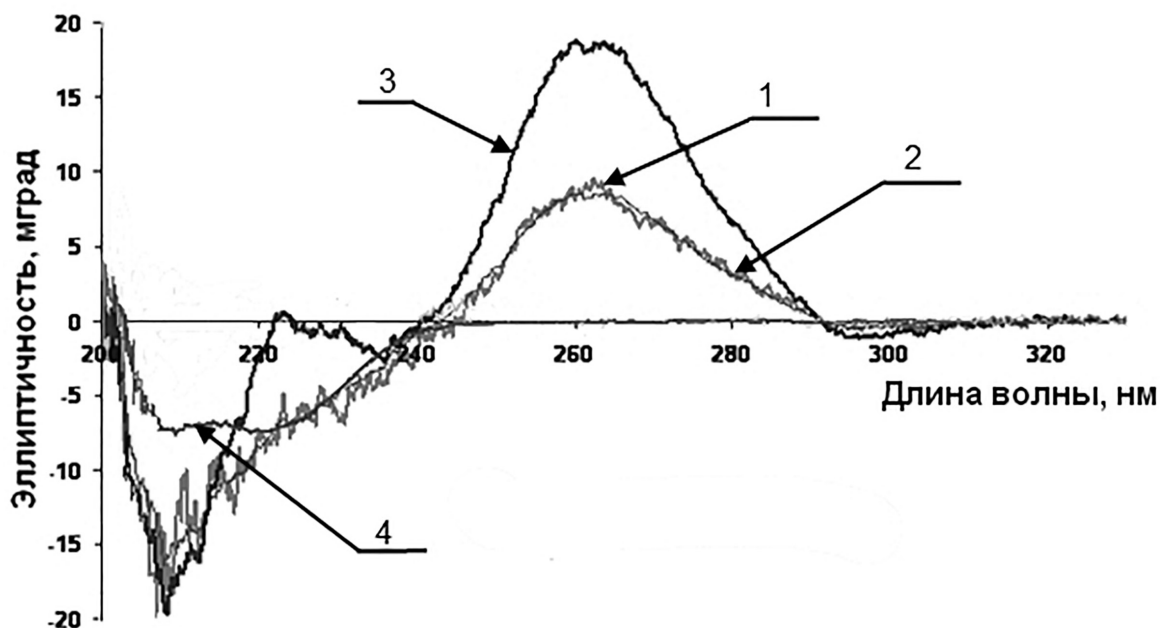


Рис. 4. КД-спектры молекулярной конструкции и ее компонентов (дельтаферон, дсРНК).

1 — спектр смеси компонентов молекулярной конструкции, 2 — молекулярная конструкция,
3 — дсРНК, 4 — дельтаферон

Анализ молекулярной конструкции и ее компонентов методом кругового дихроизма показал, что КД-спектр дсРНК имеет форму, характерную для А-формы нуклеиновых кислот (рис. 4). Максимум КД-спектра образца дсРНК расположен вблизи максимума поглощения нуклеиновых кислот (261 нм и 257 нм, соответственно), а в отрицательной полосе имеется локальный минимум в районе 235 нм [1].

Спектры КД дельтаферона характерны для α -спиралей белков: наблюдается отрицательная полоса в области спектра от 200 до 350 нм, имеющая два локальных минимума в районе 210 и 220 нм [7].

Спектр кругового дихроизма молекулярной конструкции являлся аддитивной суммой спектров дельтаферона и дсРНК (см. рис. 4). Видно, что спектр модельной смеси компонентов конструкции (линия № 1) и экспериментальный спектр молекулярной конструкции (№ 2) достаточно хорошо совпадают между собой.

Таким образом, анализ гранулометрического состава образцов молекулярных конструкций, содержащих дельтаферон и дсРНК, показал, что в результате сборки образуются относительно однородные по размеру сферические наночастицы с диаметром около 200

нм (94% от общего количества частиц), сохраняющие свои характеристики после лиофилизации и хранения в составе лиофилизированных образцов. Результаты спектрометрического исследования свидетельствуют об отсутствии значительных конформационных перестроек во вторичной структуре как белкового, так и нуклеинового компонентов молекулярной конструкции.

Для проверки сохранности биологических свойств основных активных компонентов конструкции была проведена оценка противовирусной активности образца конструкции в сравнении с исходным белком дельтафероном в культуре клеток и интерферон-индуцирующей активности препарата в системе *in vivo*.

Оценка подавления размножения вируса гриппа А/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) в культуре клеток MDCK под влиянием препарата молекулярной конструкции, содержащей дельтаферон, продемонстрировала, что исследованный препарат обладал противовирусной активностью, которая проявлялась в максимальной из использованных концентраций, 667 МЕ/мл (индекс нейтрализации составил 0,8 lg). Препарат дельтаферон в тех же условиях обладал сравнимой противовирусной активностью (табл. 1).

Таблица 1

Влияние молекулярной конструкции, содержащей дельтаферон, и дельтаферона на титры вируса гриппа на клетках MDCK

Концентрация (МЕ/мл)	Титры вируса гриппа (ТЦД ₅₀ /мл, $\pm S_m$, $\pm I_{95}$), учтенные через 3 суток	
	Дельтаферон	Молекулярная конструкция
$3,335 \times 10^2$	8,1 \pm 0,21, \pm 0,41*	8,3 \pm 0,22, \pm 0,44
$6,667 \times 10^2$	7,8 \pm 0,24, \pm 0,46*	8,0 \pm 0,17, \pm 0,33*
0 (контроль вируса)	8,8 \pm 0,24, \pm 0,46	8,8 \pm 0,24, \pm 0,46

Примечание: * — отличия от контроля при $p=0,05$

В экспериментах на лабораторных мышах было установлено, что молекулярная конструкция вызывала повышение уровня ИФН-альфа сыворотки крови. Значения показателя через 3 часа после введения препарата увеличивались в 16 раз, по сравнению с показателем контроля (303 ± 107 и $18,6 \pm 2,4$ пг/мл, соответственно; различия статистически значимы, $p \leq 0,05$). Повышенный уровень показателя в опытной группе сохранялся и через сутки после введения (в 4,7 раза по сравнению с контролем).

Заключение

Установлено, что разработанная ранее технология получения молекулярной конструкции, содержащей два противовирусных агента, дельтаферон и дсРНК, позволяет получать относительно однородные по размеру сферические наночастицы диаметром около 200 нм. Структура входящих в состав частиц компонентов не изменяется, они сохраняют высокую противовирусную и интерферон-индуцирующую ак-

тивность. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки на основе данной молекулярной конструкции нового противовирусного препарата.

Литература

1. Иванов В.И. Круговой дихроизм и структура комплементарных нуклеиновых кислот // Молекул. биология. — 1973. — Т. 7. — С. 105–140.
2. Коровина О.С., Корнеев Д.В., Левагина Г.М., Богрянцева М.П., Масычева В.И. Исследование физико-химических свойств нового препарата дельтаферона в составе молекулярной конструкции // Биотехнология. — 2012. — № 2. — С. 73–77.
3. Марышева А.А., Коровина О.С. Получение и характеристика нанопрепарата — аналога интерферона-гамма / Rusnanotech-09: Междунар. форум по нанотехнологиям, 6–8 окт. 2009 г.: Сб. тез. докл. 2-го Междунар. конкурса науч. работ молодых ученых в области нанотехнологий. — М., 2009. — С. 865–866.
4. Патент РФ № 2386447. Противоопухолевое средство на основе наночастицы, несущей рекомбинантный фактор некроза опухолей альфа / Масычева В.И., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д., Сыроева Г.М., Гамалей С.Г. Заявка 2008140246 от 13.10.2008; опубл. 20.04.2010.
5. Татьков С.И., Смирнова О.Ю., Цивковский Р.Ю., Ильичев А.А. Гамма-интерфероны человека с измененным С-концом и их свойства // Мол. биология. — 1995. — Т. 29. — С. 1095–1101.
6. Johnston M.I., Stollar B.D., Torrence P.F., Witkop B. Structural features of double-stranded polyribonucleotides required for immunological specificity and interferon induction // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1975. — Vol. 72. — P. 4564–4568.
7. Saxena V.P., Wetlaufer D.B. A new basis for interpreting the circular dichroic spectra of proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1971. — Vol. 68. — No. 5. — P. 969–972.
8. www.biofoam.ru.

INVESTIGATION OF THE STRUCTURAL CHARACTERISTICS, PARTICLE SIZE DISTRIBUTION AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE MOLECULAR CONSTRUCT COMPRISING GAMMA-INTERFERON ANALOGUE

O.S. IVANOVA¹, A.A. LOMZOV², G.M. LEVAGINA¹, A.V. BATENEVA¹, L.N. SHISHKINA¹, M.O. SKARNOVICH¹, M.A. SKARNOVICH¹, V.I. MASYSHEVA¹, E.D. DANILENKO¹

¹ Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Berdsk, Novosibirsk region;

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

A size distribution study, structural characteristics and biological properties of the molecular structure containing double-stranded RNA molecules in a coating of dextran conjugate deltaferon (analog gamma interferon) and spermidine were investigated. The methods of UV and CD spectroscopy show no significant conformational changes in the structure of the design components and the identity of the original molecule and deltaferon dsRNA. Analysis of particle size distribution of the samples revealed the presence of molecular structures of uniform size spherical particles with sizes around 200 nm, with antiviral and interferon-inducing activity.

Keywords: molecular structure and spectral characteristics, particle size distribution, antiviral activity of interferon-inducing activity.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФОТОСИНТЕЗА И УДЕЛЬНАЯ СКОРОСТЬ ПРИРОСТА ЧИСЛЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА И ШУНГИТА

Г.А. ДАЛЛАКЯН*

ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

Исследована эффективность защиты микроводорослей от токсического действия фотосенсибилизатора при различных способах обработки питательной среды шунгитом. Водоросли выращиваются в питательной среде, настоянной на шунгите в течение трех дней, или в среде культивирования водорослей постоянно присутствует шунгит. В качестве объекта исследования была выбрана альгологически чистая культура *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Gréb. На основании линейных уравнений регрессии показано, что в контрольных пробах (водоросли росли в средах без шунгита и красителя) эффективность фотосинтеза на 62% связана с изменением удельной активности прироста численности популяции микроводорослей. Эта связь равна 70 и 64% с наличием шунгита в среде и в среде, настоянной на шунгите, соответственно. В пробах с эозином эта связь умеренная и составляет 43%, что объясняется угнетающим действием эозина на рост культуры. При наличии шунгита в среде защита от фотосенсибилизатора происходит в течение всего времени роста культуры, в обработанных средах — только на начальной стадии роста и с меньшей эффективностью. При отсутствии в среде эозина шунгит стимулирует рост культуры, выступает одновременно как сорбент и антиоксидант, изменяет редокс-потенциал среды. Результаты проведенных опытов свидетельствуют о том, что среда, обработанная шунгитом, инактивирует токсическое действие эозина в меньшей степени, чем при постоянном присутствии шунгита в среде.

Ключевые слова: водоросли, шунгит, хлорофилл, эозин, флуоресценция.

Введение

В последние годы наблюдается активное использование шунгита для лечения различных заболеваний человека. Химический состав шунгита изучается интенсивно, однако его влияние на биологические объекты исследовано недостаточно.

В Зажогинской породе шунгита Карелии доля фуллереноподобного углерода составляет 30%, остальная часть приходится на силикатные минералы, равномерно распределенные в углеродной матрице, а также минеральные включения кремния, алюминия, железа, магния, калия, серы, кальция, фосфора и др. [5]. В 1992 году в породе шунгита Карелии был обнаружен фуллерен [11]. Известно, что фуллерены могут встраиваться в биологические мембраны, влиять на их структуру,

изменять каталитическую активность мембранных ферментов [7, 9]. Показано, что в проходящей через шунгит воде быстро окисляются органические молекулы и свободные радикалы. При этом содержание в ней бактерий снижается в десятки раз [1, 12]. Важную роль в очистке воды от загрязняющих веществ и стабилизации энергетического баланса воды играют абсорбционные свойства шунгита и фуллереноподобные вещества. Ряд авторов предполагает, что фуллерены, входящие в состав шунгита, изменяют окислительно-восстановительный потенциал среды и структуру воды, тем самым способствуют очистке воды от вредных для здоровья человека веществ [2].

Водоросли являются основными продуцентами органического вещества в водоеме и первичными мишенями для различных вредных веществ, поступающих в водные экосистемы. Кроме того, водоросли являются общепризнанным тест-объектом для биотестирования токсического действия различных веществ.

Целью данной работы является исследование защитных свойств шунгита от фотосенсибилизатора эозина в условиях постоянного присутствия шунгита в среде культивирования микроводорослей или при использовании его в качестве «активатора» питательной среды.

© 2015 г. Даллакян Г.А.

* **Автор для переписки:**

Даллакян Генарис Арменакович

канд. биол. наук, ст.н.с. кафедры гидробиологии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

119234 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

E-mail: honaris@bk.ru

Материалы и методы

Объектом исследования была альгологически чистая культура *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb, которая выращивалась в конических колбах объемом 100 мл в среде Успенского № 1 при температуре 25 °С и круглосуточном освещении 15 мкмольквантов м⁻²с⁻¹. В экспериментах использовался шунгит с Забогинского месторождения от компании «Арго» из расчета 100 г/л. Генератором синглетного кислорода служил фотосенсибилизатор эозин (динатриевая соль эозина C₂₀H₈Br₄Na₂O₅) в количестве 5 мг/л. Эозин и шунгит добавляли в среду однократно на 3 сут. после посева культуры водорослей. Шунгит предварительно обрабатывали согласно инструкции изготовителя с учетом специфики выращивания водорослей. Для этого гранулы шунгита размером от 2 до 8 мм промывали холодной водой, затем высыпали в 3-литровую стеклянную банку и настаивали в воде в течение 2 суток, после чего снова промывали дистиллированной водой для удаления посторонних примесей и автоклавились при температуре 120 °С и 1 атм 30 мин. После такой обработки шунгит добавляли в культуральную среду. В обработанных пробах с шунгитом после удаления примесей шунгитовые гранулы второй раз добавляли в 3-литровую колбу с дистиллированной водой и настаивали 3 суток. Далее настоянная на шунгите вода была использована для приготовления питательной среды с последующим автоклавированием.

Численность клеток подсчитывали в камере Горяева в световом микроскопе. Определение живых и мертвых клеток в культуре осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа Carl Zeiss Axioscop 2 FS Plus в проходящем свете. При облучении объекта короткими сине-фиолетовыми лучами получали длинноволновое видимое свечение объекта. Живые клетки имели ярко-красное свечение, а мертвые — зеленое. Интенсивность флуоресценции хлорофилла и кинетику индукции флуоресценции рассчитывали по показателям F₀ и F_m, которые измерялись на приборе «МЕГА-25» [8].

Для краткости обозначения проб в таблицах и рисунках используются следующие сокращения:

- Водоросли, выращенные на питательной среде без каких-либо добавок (контроль).
- Водоросли, выращенные на питательной среде с шунгитом и эозином (шунгит + эозин).
- Водоросли, выращенные на среде, для приготовления которой использовали воду, настоянную на шунгите (обработанная среда + эозин).

- Водоросли, выращенные с добавлением эозина (среда + эозин).

Эксперименты проводили в трех повторностях длительностью 18 суток. Статистическую обработку результатов проводили в программе Excel-2010. При анализе данных рассчитывали доверительный интервал и критерий Стьюдента для уровня значимости 0,05.

Результаты и обсуждение

На рисунке 1, представлены скорости прироста (Р) численности клеток популяции водорослей *Scenedesmus quadricauda*. Значение скорости прироста численности водорослей больше в присутствии шунгита в среде (кривая 2), хотя в питательной среде присутствует эозин. Присутствие в среде только эозина подавляет скорость прироста популяции (кривая 4). Ранее в опытах, проведенных в рамках данной работы, было показано, что шунгит инактивирует токсическое действие фотосенсибилизатора [3].

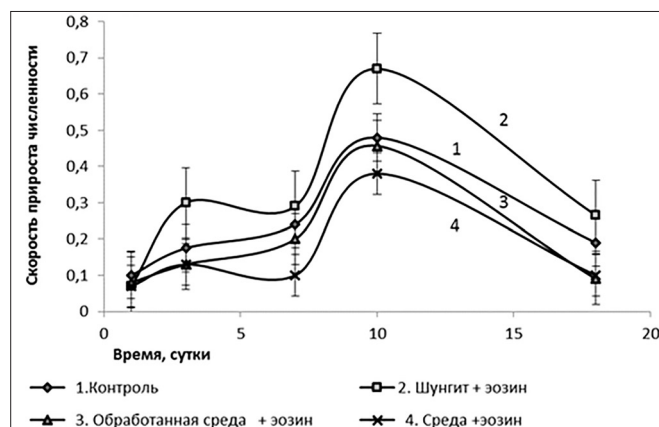


Рис. 1. Скорости прироста численности водорослей $P = \Delta N / \Delta t$

Как видно из рисунка 1, в среде, обработанной шунгитом, и в контроле скорость прироста популяции находится в пределах ошибки эксперимента (кривые 1 и 3). Следовательно, в среде, предварительно обработанной шунгитом в течение 10 суток, прирост культуры сравним с контролем, далее прирост резко снижается.

Соединения, содержащиеся в составе шунгита, приводят к стабилизации питательной среды частично. Начиная с десятых суток их концентрация в значительной степени уменьшается. Возможно, эти соединения в первые трое суток инактивируют действие эозина [4]. Далее, их концентрации недостаточно для стабилизации состояния среды. Характерные максимумы на третьи и десятые сутки роста культуры (см. рис. 1)

соответствуют началу и концу логарифмической фазы роста популяции.

Вместе с исследованием прироста численности популяции была изучена интенсивность флуоресценции хлорофилла водорослей (рис. 2).

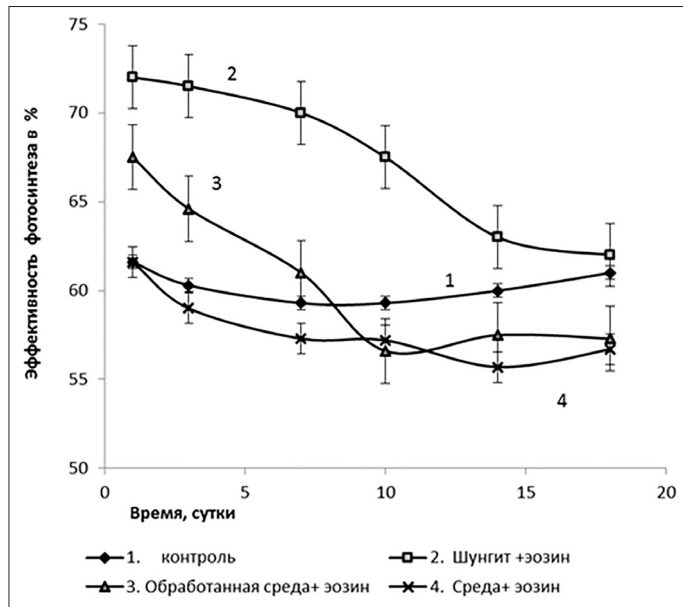


Рис. 2. Эффективность фотосинтеза (F_v/F_m) в различных условиях среды

На рисунке 2 представлены изменения фотохимического квантового выхода фотосистемы II. Эффективность фотосинтеза $\psi = F_v/F_m$ рассчитана по формуле $\psi = (F_m - F_0)/F_m$, где F_0 — интенсивность флуоресценции при открытых реакционных центрах фотосистемы II, F_m — интенсивность флуоресценции при закрытых реакционных центрах [8]. Сопоставление эффективности ФС (см. рис. 2) и скорости прироста клеток *Scenedesmus quadricauda* (см. рис. 1) показывает, что эффективность фотосинтеза больше в пробах, где скорость прироста культуры выше. Эта закономерность наблюдается для всех проб вне зависимости от наличия исследуемых веществ в среде. Полученные данные подтверждают представление о том, что эффективность фотосинтеза коррелирует со скоростью прироста культуры [6]. Эффективность фотосинтеза в обработанных пробах с шунгитом (см. рис. 2, кривая 3) больше, чем в контроле; после 7-х суток она становится меньше, чем в контроле. Возможно, это связано с окислением соединений, входящих в состав шунгита, способствующих росту культуры и инактивации эозина.

На рисунке 3 показана индукция хлорофилла на 5-е сутки роста культуры, в начале логарифмической фазы роста. Как видно, O-J-I-P кинетика индукции флуоресценции в пробах с эозином меньше, чем в осталь-

ных пробах; при этом в различных точках кинетической кривой разница составляет от 35 до 50%.

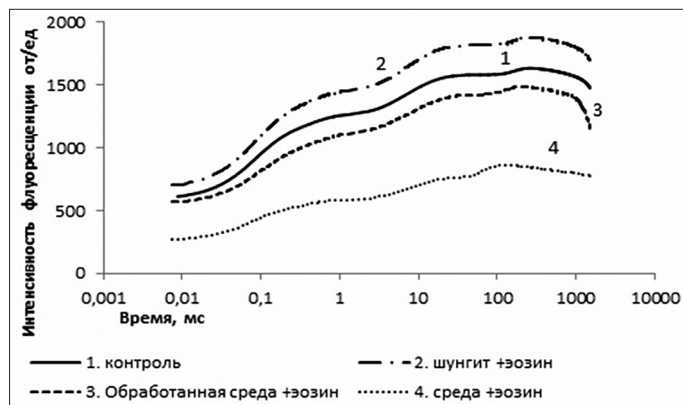


Рис. 3. Кривые индукции флуоресценции хлорофилла на 5-е сутки роста популяции в различных условиях среды

Исследование кинетики флуоресценции хлорофилла позволяет получить информацию о состоянии реакционных центров и электрон-транспортной цепи в мембранах [10]. На основании этих результатов (см. рис. 3) можно предположить, что в пробах с высоким значением флуоресценции (кривые 1–3) перенос электронов происходит наиболее интенсивно в световой стадии фотосинтеза.

Результаты опытов свидетельствуют о том, что обработанная шунгитом среда инактивирует токсическое действие эозина в меньшей степени, чем при постоянном наличии шунгита в среде.

Как видно из таблицы 1, во всех пробах коэффициент корреляции между эффективностью фотосинтеза и удельной скоростью роста популяции высокий, особенно в пробе при постоянном наличии шунгита. Известно, что разность $100 - R^2$ представляет собой процент дисперсии, который нельзя объяснить регрессией. Тогда в контрольных пробах эффективность фотосинтеза на 62% связана с изменением удельной активности прироста численности популяции, а на 38% обусловлена другими факторами.

В пробах с наличием шунгита в среде и «активированных» средах это соотношение равно 70–30% и 64–36%, соответственно. В пробах с эозином эта связь умеренная и составляет 43–57%, что связано с токсическим действием эозина на рост культуры популяции (см. рис. 1, кривая 4).

Таким образом, сравнение результатов скорости прироста культуры и флуоресценции хлорофилла водорослей показывает, что «активированная» среда частично содействует росту культуры и инактивирует токсическое действие эозина.

**Линейные уравнения регрессии, коэффициенты детерминации
и корреляции в различных условиях среды культивирования**

Условия среды культивирования водорослей	Уравнение регрессии	Коэффициенты детерминации	Коэффициенты корреляции
Контроль	$y=59+2,74x$	$R^2=0,62$	$r=0,78$
Шунгит + эозин	$y=64,51+9,7x$	$R^2=0,7$	$r=0,83$
Обработанная среда + эозин	$y=55,7+16,77x$	$R^2=0,64$	$r=0,8$
Среда + эозин	$y=55,82+7,1x$	$R^2=0,43$	$r=0,65$

Примечание: y — эффективность фотосинтеза (F_u/F_m); x — удельная скорость прироста численности $b = N_n / \Delta tN$

Исследование живых и мертвых клеток в культуре показало, что процент живых клеток больше, когда увеличение прироста численности совпадает с увеличением флуоресценции, и наоборот. В контрольных пробах и в пробах с шунгитом водоросли крупные и в основном по 4 ценобия. В пробах с наличием только эозина клетки водорослей большей частью по 2 ценобия, а клетки в «активированных» пробах по 4 ценобия в начальный период роста, а далее, наоборот, — по 2 ценобия.

Заключение

Стимуляция роста культуры *Scenedesmus quadricauda* в присутствии шунгита по сравнению с ростом культуры в чистой среде и улучшение роста культуры при комбинированном действии фотосенсибилизатора и шунгита подробно рассматриваются в работе [3]. В «активированных» средах фуллереноподобные соединения, которые входят в состав шунгита, растворяются в воде и изменяют свойства воды. При настаивании шунгита в воде в течение нескольких часов (в наших опытах 3 суток) вокруг каждого фуллерена образуется многослойная оболочка из молекул воды, которую называют структурированной водой [2]. Тем самым создаются условия для благоприятного роста культуры. Возможно, что часть этих фуллереноподобных соединений образует комплекс с эозином и инактивирует его токсическое действие.

Итак, для стимулирования роста популяции водорослей и для очистки воды от токсикантов не обязательно постоянное присутствие шунгита в воде, а достаточно настаивания воды на шунгитовых гранулах. По ряду показателей и с помощью микроскопических наблюдений установлено, что водоросли намного лучше растут, когда в среде присутствует шунгит, или используется среда, «активированная» шунгитом. Это видно под микроскопом

— клетки водорослей в шунгитной среде более крупные, большей частью состоящие из 4 ценобиев.

На основании сравнительного анализа проведенных в рамках работы экспериментов и литературных данных можно заключить, что при постоянном присутствии в среде шунгит одновременно выступает как сорбент, антиоксидант, а также изменяет редокс-потенциал среды. В «активированных» средах, где нет шунгита, действуют вышеперечисленные механизмы, за исключением абсорбции.

Таким образом, шунгит стимулирует рост численности популяции микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* не только при постоянном его присутствии в среде, но и в среде, «активированной» шунгитом. Менее эффективная защита от токсиканта в обработанных пробах, возможно, связана с отсутствием абсорбции на поверхности шунгита.

Литература

1. Воейков В.Л., Асфарамов Р.Р., Тимофеев К.Н., Воейкова Т.А. Природная технология очистки воды: физико-химические процессы, обеспечивающие очистку воды при ее просачивании через шунгит и доломит / Материалы Междунар. конф. «Новые технологии в защите биоразнообразия в водных экосистемах». — М.: МАКСПресс, 2002. — С. 16.
2. Воейков В.Л., Виленская Н.Д., Минь Ха До, Малышенко С.И., Буравлева Е.В., Яблонская О.И., Тимофеев К.Н. Устойчиво неравновесное состояние бикарбонатных водных систем // Журнал физической химии. — 2012. — Т. 86. — № 9. — С. 1518–1527.
3. Даллакян Г.А. Рост популяции микроводорослей в зависимости от концентрации эозина в питательной среде // Вода: химия и экология. — 2014. — № 6. — С. 117–121.
4. Даллакян Г.А. Рост популяции микроводорослей в условиях питательных сред, обогащенных синглетным

- кислородом // Известия РАН, серия биологическая. — 1998. — № 6. — С. 751–753.
5. Каленин Ю.К. Экологический потенциал шунгита // Наука в России. — 2008. — № 6. — С. 39–44.
 6. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Яковлева О.В., Позосян С.И. Определение состояния растений и водорослей по флуоресценции хлорофилла. — М.: «МАКСПресс», 2010. — 116 с.
 7. Пиотровский Л.Б., Еропкин М.Ю., Еропкина Е.М., Думпис М.А., О.И. Киселев О.И. Механизмы биологического действия фуллеренов — зависимость от агрегатного состояния // Психофармакол. биол. наркол. — 2007. — Т. 7. — № 2. — С. 1548–1554.
 8. Позосян С.И., Гальчук С.В., Казимирко Ю.В., Конюхов И.В., Рубин А.Б. Применение флуориметра «МЕГА-25» для определения количества фитопланктона и оценки состояния его фотосинтетического аппарата // Вода: химия и экология. — 2009. — № 6. — С. 34–40.
 9. Andrievsky G.V., Bruskov V.I., Tykhomyrov A.A., Gudkov S.V. Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C60 fullerene nanostructures in vitro and in vivo // Free Radical Biology and Medicine. — 2009. — Vol. 47. — P. 786–793.
 10. Antal T.K., Matorin D.N., Ilyash L.V., Volgusheva A.A., Osipov V.A., Konyuhov I.A., Krendeleva T.E., Rubins A.B. Probing of photosynthetic reactions in four phytoplanktonic reactions in four phytoplanktonic algae with a PEA fluorometer // Photosynthesis Research. — 2009. — Vol. 102. — P. 67–76.
 11. Buseck P.R., Tsipursky S.J., Hettich R. Fullerenes from the geological environment // Science. — 1992. — Vol. 257. — No. 5067. — P. 215–217.
 12. Voeikov V.L. Reactive oxygen species (ROS); pathogens or sources of vital energy? Part 1. ROS in normal pathologic physiology of living systems // Journal of Alternative and Complementary Medicine. — 2006. — Vol. 12. — No. 2. — P. 111–118.

THE EFFICIENCY OF PHOTOSYNTHESIS, AND THE SPECIFIC RATE OF GROWTH IN THE NUMBER OF ALGAE POPULATIONS UNDER THE ACTION OF A PHOTOSENSITIZER AND SHUNGITE

G.A. DALLAKYAN

M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

The efficiency of the protection of algae from the toxic action of the photosensitizer at different ways of nutrient medium shungite processing was studied. Algae were grown in a culture medium, infused with shungite for three days, or in the algae culture medium with constant presence of shungite. As an object of study was chosen algological pure culture of *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. Based on linear regression equations it was shown that in the control samples (algae growing in media lacking shungite and dye) photosynthetic efficiency of 62% is associated with a change in the specific activity of the microalgae growth population numbers. This bond is 70 and 64% with the presence of shungite in the environment and in an environment infused with shungite, respectively. In samples with eosin this relationship is moderate and 43% due to the inhibitory effect on the growth of a culture of eosin. Shungite in the presence of a photosensitizer protection medium occurs during the growth of the culture time in the treated environments — only at the initial stage of growth with less efficiency. In the absence of eosin in the medium of culture the shungite stimulates growth sorbent acts as both an antioxidant and alters the redox potential of the medium. The results of these experiments indicate that the medium treated by shungite inactivates the toxic effect of eosin to a lesser extent than in the continuous presence of shungite in the medium.

Keywords: algae, shungite, chlorophyll, eosin, fluorescence.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СОХРАНЕНИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ *ARTHROSPIRA PLATENSIS* И *SPIRULINA SUBSALS* ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ ПРИ -80°C

Д.И. ПЕТРУХИНА, И.Н. ЛЫКОВ*

Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского, Калуга

Обобщены результаты исследований по эффективности сохранения цианобактерий *Arthrospira platensis* и *Spirulina subsalsa* после криоконсервации диметилсульфоксидом при температуре -80°C . Представлены данные о степени влияния концентрации и температуры криопротектора (диметилсульфоксида) на скорость роста исследуемых штаммов после криохранения при температуре -80°C . Определена остаточная концентрация диметилсульфоксида в питательной среде после размораживания проб и переноса криосохраненного материала в колбы для выращивания. Исследовано влияние размера агломератов *Arthrospira platensis* и *Spirulina subsalsa* на их выживаемость после криоконсервирования. Установлена оптимальная длительность хранения криоконсервированных проб исследуемых штаммов в морозильной камере при температуре -80°C .

Ключевые слова: цианобактерии, криоконсервация, криопротектор, удельная скорость роста.

Введение

Развитие индустрии микроводорослей охватывает такие сферы биотехнологического производства, как производство белка, кормов для птицеводства и рыбоводства, сырья для фармацевтической промышленности, производство удобрения и биотоплива. Для этого необходимы создание и поддержание коллекций культур цианобактерий, что является дорогостоящим и трудоемким процессом. При этом традиционная процедура последовательного пересева субкультур часто приводит к их загрязнению и потере исследовательских видов [8]. Альтернативные методы, такие как сохранение при температуре -80°C , хорошо подходят для решения этих проблем [4], а также для избежания генетического дрейфа, который влияет на фенотипические признаки штаммов цианобактерий [5].

Работы по криоконсервации крупных многоклеточных объектов проводятся часто с высшими растениями, где используют *in vitro* культуры [2, 3], а также

в регенеративной медицине, например, для сохранения эпидермальных клеток на подложке [6].

Целью данной работы было изучение эффективности сохранения цианобактерий *Arthrospira platensis* и *Spirulina subsalsa* после криоконсервации диметилсульфоксидом при температуре -80°C .

Для выполнения этой цели были изучены:

- степень влияния концентрации и температуры криопротектора (диметилсульфоксида) на скорость роста исследуемых штаммов после криохранения при -80°C ;
- остаточная концентрация диметилсульфоксида в питательной среде после размораживания проб и переноса криосохраненного материала в колбы для выращивания;
- влияние размера агломератов *Arthrospira platensis* и *Spirulina subsalsa* на их выживаемость после криоконсервирования;
- длительность хранения криоконсервированных проб исследуемых штаммов в морозильной камере при -80°C .

Материалы и методы

В настоящем исследовании использовали штаммы *Arthrospira platensis* PCC 9223 и *Spirulina subsalsa* PCC 9445 из коллекции культур Университета Пастера, Франция. Все процедуры проводили в стерильных условиях.

© 2015 г. Петрухина Д.И., Лыков И.Н.

* Автор для переписки:

Лыков Игорь Николаевич

кандидат медицинских наук, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой ботаники, микробиологии и экологии Института естествознания,

Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского 248023 Калуга, ул. Степана Разина, 26

E-mail: linprof47@yandex.ru

Штаммы *Arthrospira* или *Spirulina* использовались нами в виде агломератов. В литературе нет данных о попытках криохранения этих штаммов, растущих не в виде клеточной суспензии.

Штаммы выращивали в агломерированном виде на стандартной питательной среде Заррука с рН 9,6 [10], после чего с помощью пинцета агломераты переносили в криофлаконы с диметилсульфоксидом и замораживали.

Для основных экспериментов с целью получения нужного количества биомассы цианобактерии культивировали в автоклавированных конических стеклянных колбах Эрленмейера с широким горлышком и номинальным объемом 50–100 мл.

Питательную среду Заррука стерилизовали фильтрованием через фильтр из ацетата целлюлозы (диаметр пор 0,45 мкм) и в количестве 25–50 мл добавляли в колбы Эрленмейера.

Культуры выращивали в инкубаторе Minitron при температуре 30 °С при постоянном перемешивании с помощью встроенного орбитального шейкера диаметром качания 25 мм. Скорость перемешивания составляла 110 об/мин. Освещение обеспечивали шестью люминесцентными лампами Grolux (15W), которые располагались над колбами на высоте 40 см, обеспечивая среднюю интенсивность света на поверхности клеточной суспензии 21 мкмоль/(м²с). Выращивание культур осуществляли с циклом 16 ч день / 8 ч ночь в течение 25 дней до замораживания.

После 25 дней выращивания питательную среду удаляли, а клеточные агломераты *Arthrospira platensis* РСС 9223 и *Spirulina subsalsa* РСС 9445 дважды промывали стерильной дистиллированной водой. Промытые агломераты пинцетом помещали в полипропиленовые криофлаконы с завинчивающейся крышкой объемом 2 мл. В эти же криофлаконы в качестве криопротектора добавляли 1,8 мл стерильного раствора диметилсульфоксида.

Криопротектор охлаждали до температуры 4±0,1 °С, 10±0,5 °С и 25±1,0 °С. Температура в 25 °С достигалась термостатированием на водяной бане в течение 5 часов. Для достижения температуры в 4 °С и 10 °С криопротектор помещали на 5 часов в лабораторную холодильную камеру с соответствующей температурой (4 °С или 10 °С).

Агломераты выдерживали в растворе криопротектора в темноте в течение 10 мин. при периодическом перемешивании, после чего помещали в контейнер, предварительно охлажденный до 4 °С. Данный контейнер обеспечивал воспроизводимую скорость охлаждения

-1 °С в минуту и использовался со 100%-ным изопропиловым спиртом.

Контейнер помещали в морозильную камеру при температуре -80 °С. Через 1,5 часа пробы перемещали из контейнера в пластиковые боксы и хранили при -80 °С до последующего анализа в течение 7, 60 и 90 суток. Каждая проба имела свою индивидуальную маркировку. Все пробы замораживались минимум в трех повторностях.

После хранения пробы извлекали из камеры для размораживания и последующего выращивания. Для размораживания пробы с криоконсервированными образцами выдерживали в течение 2–3 минут в водяной бане при температуре 37 °С. После размораживания удаляли супернатант и агломераты дважды промывали свежей питательной средой Заррука. Промытые агломераты инокулировали в стерильную колбу Эрленмейера с 5 мл свежей стандартной среды Заррука.

Размороженные агломераты для предотвращения фотоокисления культивировали при комнатной температуре в течение первых 40 мин. в темноте, после чего в колбы были добавлены еще по 5 мл среды Заррука. Последующее культивирование проходило в течение 2 часов при освещении 10–12 мкмоль фотонов/(м²с). Затем агломераты выращивали в инкубаторе Minitron как исходные культуры.

Для проверки возможного ингибирующего действия криопротектора размороженные агломераты культивировали в присутствии диметилсульфоксида в концентрациях 0,3, 0,5, 1,0, 2,0 и 2,5% (об./об.).

Контрольные образцы были инокулированы агломератами культур того же размера, что и исследуемые. Их выращивали параллельно с криокультурами. Для сравнения эффективности роста рекультивированных и контрольных культур определяли удельную скорость роста по формуле:

$$\mu = (\Delta \ln X / X_0) / \Delta t, \text{ сутки}^{-1},$$

где: X и X₀ — значения величины сухого вещества в конце и начале ростового цикла, г;

Δt — длительность ростового цикла, сутки.

Для определения массы сухого вещества агломераты дважды промывали от культуральной среды дистиллированной водой на заранее взвешенных фильтрах из ацетата целлюлозы (диаметр пор 6,8 мкм) и взвешивали. Затем фильтры с образцами культур высушивали до постоянного веса в сушильном шкафу при температуре 103 °С.

Достоверность различий выборочных средних оценивали с помощью t-критерия Стьюдента [7]. Различия

между сравниваемыми параметрами считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде $M \pm m$.

Результаты и обсуждение

Цианобактерии *Spirulina subsalsa* PCC 9445 и *Arthrospira platensis* PCC 9223 были заморожены в течение 7 дней в присутствии криопротектора диметилсульфоксида в различной концентрации. Результаты исследования показали, что диметилсульфоксид в концентрации 10 и 15% (об./об.) лучше защищает культуры цианобактерий во время хранения (табл. 1).

Таблица 1

Количество проб с выжившими агломератами после криохранения в течение 7 дней в присутствии диметилсульфоксида в различной концентрации (было заморожено по 5 проб для каждой исследуемой концентрации)

Концентрация диметилсульфоксида (% об./об.)	Количество проб с выжившими агломератами*	
	<i>Arthrospira platensis</i>	<i>Spirulina subsalsa</i>
1	0	0
5	3	4
10	5	5
15	5	5
20	0	0
30	0	0

Примечание: * — выжившими считали агломераты цианобактерий, у которых фиксировали прирост сухой биомассы после выращивания в течение 25 дней при температуре 30 °С и интенсивности освещения 21 мкмоль/(м²с)

Поэтому в дальнейших экспериментах цианобактерии *Spirulina subsalsa* PCC 9445 и *Arthrospira platensis* PCC 9223 были заморожены в присутствии диметилсульфоксида в концентрации 10 и 15% (об./об.). После хранения в течение 7 дней при температуре -80 °С была проанализирована скорость роста цианобактерий после 25 дней культивирования при 30 °С и 21 мкмоль/(м²с). Полученные данные (табл. 2) показали, что в присутствии диметилсульфоксида в концентрации 10% (об./об.) скорость роста *Spirulina subsalsa* и *Arthrospira platensis* после хранения при температуре -80 °С в течение 7 дней составила 73,6 и 85,1% от контроля, соот-

ветственно, по сравнению с 31,2 и 21,3% в присутствии диметилсульфоксида в концентрации 15% (об./об.).

Таблица 2

Скорость роста рекультивированных культур после криохранения в течение 7 дней в присутствии диметилсульфоксида в концентрации 10 и 15%

Концентрация диметилсульфоксида % (об./об.)	Скорость роста (μ, % от контроля)	
	<i>Arthrospira platensis</i>	<i>Spirulina subsalsa</i>
10	75,6±1,9	84,12±1,6
15	31,2±1,5	21,3±2,3

В дальнейших экспериментах было исследовано влияние размеров агломератов на эффективность криосохранения при температуре -80 °С в присутствии диметилсульфоксида в концентрации 10% (об./об.).

Исследования продемонстрировали, что среди исследованных размеров оптимальная скорость роста наблюдалась при культивировании агломератов цианобактерий размером 4±0,5 и 6±0,5 мм (табл. 3). В последующих исследованиях использовали размер агломератов 4±0,5 мм.

Таблица 3

Влияние размеров агломерата на скорость роста (μ, % от контроля) рекультивированных культур после криохранения в течение 7 дней (данные представлены в % от контрольной пробы, которая не была сохранена при -80 °С)

Размер агломератов	Скорость роста (μ, % от контроля)	
	<i>Arthrospira platensis</i>	<i>Spirulina subsalsa</i>
2±0,5 мм	35,7±1,8	44,12±1,4
4±0,5 мм	72,86±2,0	86,1±1,1
6±0,5 мм	68,61±1,9	80,2±2,3

По данным различных авторов, для сохранения некоторых видов цианобактерий рекомендуется использовать криопротектор при температурах от 0 до 10 °С, так как это защищает клетки от токсичности криопротекторов [1, 9]. В связи с этим возникла необходимость оценить влияние начальной температуры диметилсульфоксида перед криохранением на скорость роста культур *Spirulina subsalsa* и *Arthrospira platensis* после криохранения. Для этого в культуры добавляли 10% криопротектор с температурой 4, 10 и 25 °С.

Было установлено, что наилучшие результаты получены в экспериментах с диметилсульфоксидом, охлажденным до 4 °С (табл. 4). По мере увеличения температуры скорость роста культур снижалась, что свидетельствует о возможном влиянии температуры на токсичность диметилсульфоксида. Для дальнейших исследований нами выбрана температура криопротектора перед криоконсервацией 4 °С.

Чтобы выяснить, необходимо ли промывание оттаявших агломератов от диметилсульфоксида и его влияние на рекультивируемые культуры, пробы после оттаивания культивировали в присутствии криопротектора в концентрациях 0,3, 0,5, 1,0, 2,0 и 2,5 % (об./об.). Было обнаружено, что при остаточной концентрации диметилсульфоксида более 1% скорость роста *Spirulina* и *Arthrospira* по сравнению с контролем составила менее

49% (табл. 5). При концентрации менее 1% скорость роста *Spirulina* и *Arthrospira* сохранилась на уровне 73,25 и 75,1%, соответственно. Таким образом, диметилсульфоксид в концентрации более 1% оказывает токсическое воздействие на микроводоросли, что требует более тщательного промывания оттаявших агломератов.

В ходе дальнейшего изучения было выявлено, что с увеличением срока криохранения *Spirulina* и *Arthrospira* при температуре -80 °С скорость роста рекультивируемых культур может снижаться (табл. 6).

Наилучшая скорость роста рекультивируемых культур наблюдалась после семидневного криохранения. После двух- и трехмесячного хранения скорость прироста биомассы снижалась у *Arthrospira platensis* на 27 и 41%, соответственно, а у *Spirulina subsalsa* – на 23 и 59%, соответственно.

Таблица 4

Влияние температуры диметилсульфоксида на скорость роста (μ, % от контроля) рекультивированных культур после криохранения в течение 7 дней (данные представлены в % от контрольной пробы, которая не была сохранена при -80 °С)

Температура диметилсульфоксида (°С)	Скорость роста (μ, % от контроля)	
	<i>Arthrospira platensis</i>	<i>Spirulina subsalsa</i>
4	72,06±2,1	85,1±1,6
10	69,86±1,6	83,1±2,1
25	58,1±1,5	70,2±2,0

Таблица 5

Скорость роста (μ, % от контроля) рекультивированных культур в присутствии диметилсульфоксида в питательной среде (пробы были сохранены в течение 7 дней в присутствии диметилсульфоксида в концентрации 10% и при температуре 4 °С)

Рекультивируемые культуры	Концентрация диметилсульфоксида в питательной среде после рекультивации % (об./об.)				
	0,3	0,5	1,0	2,0	2,5
<i>Arthrospira platensis</i>	72,02±1,2	73,25±1,7	49,30±1,2	28,98±2,2	23,19±1,8
<i>Spirulina subsalsa</i>	85,1 ± 1,1	75,1±1,8	35,2±2,1	25,7±1,7	25,1±1,5

Таблица 6

Скорость роста рекультивированных культур (μ, % от контроля) в зависимости от срока криохранения (криопротектор диметилсульфоксид в концентрации 10% и при температуре 4 °С)

Срок хранения при -80 °С, сутки	<i>Arthrospira platensis</i>	<i>Spirulina subsalsa</i>
7	73,6±2,0	85,1±2,1
60	53,6±2,7	65,1±1,9
90	43,6±1,7	35,1±2,1

Заключение

В результате проведенной работы можно сделать следующие выводы:

1. Оптимальной для криоконсервации при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ является концентрация диметилсульфоксида 10% (об./об.).

2. Наилучшая эффективность криосохранения при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в присутствии диметилсульфоксида в концентрации 10% (об./об.) наблюдалась при культивировании агломератов цианобактерий размером $4\pm 0,5$ мм.

3. Диметилсульфоксид в концентрации более 1% оказывает токсическое воздействие на микроводоросли, что требует более тщательного промывания оттаявших агломератов.

4. Наилучшая скорость роста рекультивируемых культур *Spirulina* и *Arthrospira* наблюдалась после семидневного криохранения при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, стипендии для аспирантов Erasmus Mundus Action 2 и стипендии для аспирантов от Технического университета Дрездена для раннего развития научной карьеры у женщин.

Литература

- Day J.G. Cryopreservation of Microalgae and Cyanobacteria / In: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. J.G. Day and G.N. Stacey (Eds.), ed. Totowa. — NJ: Humana Press, 2007. — P. 141–151.
- Gagliardi R.F., Pacheco G.P., Carneiro L.A., Valls J.F., Vieira M.L., and Mansur E. Cryopreservation of Arachis species by vitrification of in vitro-grown shoot apices and genetic stability of recovered plants // Cryo Letters. — 2003. — Vol. 24. — P. 103–110.
- Gagliardi R.F., Pacheco G.P., Valls J.F., and Mansur E. Cryopreservation of cultivated and wild Arachis species embryonic axes using desiccation and vitrification methods // Cryo Letters. — 2002. — Vol. 23. — P. 61–68.
- Guermazi W., Sellami-Kammoun A., Elloumi J., Drira Z., Aleya L., Marangoni R., Ayadi H., and Maalej S. Microalgal cryo-preservation using dimethyl sulfoxide (Me_2SO) coupled with two freezing protocols: Influence on the fatty acid profile // Journal of Thermal Biology. — 2010. — Vol. 35. — P. 175–181.
- Muhling M., Belay A., and Whitton B. Screening Arthrospira (Spirulina) strains for heterotrophy // Journal of Applied Phycology. — 2005. — Vol. 17. — P. 129–135.
- Pasch J. Verfahren zur Kryokonservierung epidermaler Zellen auf Kollagen-Microcarriern. — Diss., Techn. Hochsch., Aachen, 2000.
- Student. The probable error of a mean // Biometrika. — 1908. — Vol. 6. — P. 1–25.
- Tanniou A., Turpin V., and Lebeau T. Comparison of cryopreservation methods for the long term storage of the marine diatom Haslea ostrearia (Simonsen) // Cryobiology. — 2012. — Vol. 65. — P. 45–50.
- Tzovenis I., Triantaphyllidis G., Naihong X., Chatzinikolaou E., Papadopoulou K., Xouri G., and Tafas T. Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain // Aquaculture. — 2004. — Vol. 230. — P. 457–473.
- Zarrouk C. Contribution à l'étude d'une Cyanophycée, influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de «Spirulina maxima» (Setch et Gardner) Geitler. S.l. n. d: [Ph.D. thesis]. — University of Paris, Paris, France, 1966.

INVESTIGATION OF THE EFFECTIVENESS OF CONSERVATION CYANOBACTERIA ARTHROSPIRA PLATENSIS AND SPIRULINA SUBSALSA AFTER CRYOPRESERVATION AT $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ BY DIMETHYL SULFOXIDE

D.I. PETRUKHINA, I.N. LYKOV

K.E. Tsiolkovsky Kaluga State University, Kaluga

This study presents the results of investigations of preservation efficiency of cyanobacterium *Arthrospira platensis* and *Spirulina subsalsa* after cryostorage with dimethyl sulfoxide at the temperature of $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Data on influence of concentration and temperature of cryoprotectant dimethyl sulfoxide on the specific growth rate of the strains after cryostorage by $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ are presented. The optimal residual concentration of dimethyl sulfoxide in the growth medium after the cryosamples thawing is determined as well as the transfer of thawed cryosamples into the flasks for growth purposes. Influence of the *Arthrospira platensis* and *Spirulina subsalsa* agglomerate size on their survival rate after cryostorage is analyzed. Optimal duration of storage of cryopreserved samples of the investigated strains in a freezer by $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ is determined.

Keywords: cyanobacteria, cryopreservation, cryoprotectant, specific growth rate.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА НА ДИНАМИКУ ОБРАЗОВАНИЯ ЛИГНОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ *TRAMETES GIBBOSA*

Е.Э. ХАБИБУЛИНА*, А.С. БЕЛЯНИН, Е.А. БЕССОЛИЦЫНА, И.В. ДАРМОВ

ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», Киров

В работе изучено влияние стимуляторов роста на секрецию ферментов лигнолитического комплекса у *Trametes gibbosa*. Установлено, что при внесении стимуляторов роста в питательную среду происходит увеличение удельной активности исследуемых ферментов. Было показано, что кожура мандарина значительно увеличивает скорость и интенсивность синтеза лигнинпероксидазы и лакказы в 1,6 и 3,4 раза, соответственно, а скорость и интенсивность синтеза марганец-пероксидазы увеличивает культивирование в присутствии арахидоновой кислоты — в 1,8 раза.

Ключевые слова: базидиомицеты, лакказа, лигнинпероксидаза, марганец-пероксидаза, стимулятор роста.

Введение

Наиболее эффективными деструкторами лигнина являются базидиомицеты. Они синтезируют мультиферментный комплекс лигнолитического действия, непосредственно участвующий в процессе деградации лигнина. Ферменты данного комплекса неспецифичны, что позволяет использовать как сами грибы-лигниолиники, так и ферменты не только для биодеградации лигнина, но также и в системах детоксикации и деградации ксенобиотиков, биоремедиации почв и вод, в пищевой и медицинской промышленности, для биоотбеливания целлюлозы вместо хлорсодержащих отбеливателей, приводящих к загрязнению окружающей среды [1, 4].

Лигнолитические ферментные комплексы грибов, принимающие участие в модификации биополимеров древесины, включают в себя спектр множественных форм оксидоредуктаз трех основных структурных типов.

К первому типу относятся гемсодержащие ферменты, среди которых принято особо выделять лигнинпероксидазы (LiP) и марганец-пероксидазы (MnP). Основная функция этих ферментов — прямое, как у LiP, или опосредованное медиатором одноэлектронное окисление ароматических субстратов до соответствующих

радикалов и двухэлектронное восстановление перекиси водорода до воды.

К следующему типу относятся флавиносодержащие ферменты. Среди них — глюкозооксидазы, метанол-оксидазы и др.

К третьему типу относятся медьсодержащие ферменты — голубые оксидазы — лакказы и родственные им неголубые оксидазы, осуществляющие четырехэлектронное восстановление кислорода до воды с параллельным одно- или двухэлектронным окислением преимущественно фенольных субстратов до соответствующих феноксирадикалов или хинонов [7].

В связи с низкой скоростью роста базидиальных грибов (28 суток), продуцирующих ферменты лигнолитического комплекса, важно увеличить эффективность образования ферментов и сократить время культивирования грибов. Одним из таких способов является культивирование продуцентов в среде с добавлением стимуляторов роста.

Стимуляция роста базидиальных грибов решает задачу повышения эффективности способов культивирования, получения необходимых ферментов и ускорения процесса.

На основании анализа литературы, а также, исходя из доступности, были выбраны следующие стимуляторы: арахидоновая кислота, экстракт коры дуба, перфтордекалин, мандариновая кожура.

Арахидоновая кислота — омега-6-ненасыщенная жирная кислота. Она является незаменимой для некоторых животных. Кислота может самостоятельно синтезироваться в организме человека из незаменимой

© 2015 г. Хабибулина Е.Э., Белянин А.С., Бессолицына Е.А., Дармов И.В.

* Автор для переписки:

Хабибулина Екатерина Эдуардовна
магистрант 1 курса биологического факультета
ФГБОУ ВО «ВятГУ»
E-mail: khabibulina.e@mail.ru

омега-6-ненасыщенной линолевой жирной кислоты. При добавлении в среду культивирования арахидоновая кислота играет роль стимулятора роста [5].

Также известно, что лигноцеллюлозные субстраты способны индуцировать синтез лакказы при внесении их в питательную среду. Так, дубовые опилки при использовании их в качестве стимулятора гриба могут способствовать повышению синтеза лакказы, что, в свою очередь, будет интенсифицировать процесс биодеградации [3].

Перфторорганические соединения (ПФОС) представляют собой органические соединения, в которых все атомы водорода замещены атомами фтора. Жидкие ПФОС абсолютно инертны, нетоксичны, прозрачны, их удельный вес в два раза превышает плотность воды; эти уникальные свойства позволяют применять перфторорганические соединения в различных отраслях медицины, фармацевтики, биотехнологии [2].

Мандариновая кожура также способна стимулировать рост грибов в жидкой питательной среде и образование ферментов лигнолитического комплекса. Данный материал вносится в среду культивирования в качестве лигниносодержащего материала. Обнаружено, что культивирование гриба в присутствии данного материала при оптимальных условиях могут вызывать высокую продукцию ферментов [8].

Таким образом, целью настоящей работы является определение влияния стимуляторов роста на динамику образования лигнолитических ферментов базидиальных грибов.

Материалы и методы

Культивирование базидиомицетов

Исследование влияния стимуляторов на выработку ферментов проводили на *Trametes gibbosa*.

Для получения посевного материала мицелий гриба культивировали на плотной питательной среде (50 мл разведенного квасного концентрата и 350 мл воды, 8 г агара, рН среды 7–7,5) в течение 7 дней при температуре 28 °С.

По истечении срока из мицелия на поверхности среды готовили суспензию путем растирания шпателем с добавлением в чашку 2 мл физиологического раствора. Затем 0,5 мл полученной суспензии вносили в 200 мл минимальной минеральной среды (вода 1 л, глюкоза 10 г, пептон 3 г, KH_2PO_4 0,6 г, K_2HPO_4 0,6 г, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001 г, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0005 г, MnSO_4 0,05 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 г, CuSO_4 0,25 г — для индукции лакказы, CaCl_2 0,5 г — для индукции лакказы, гваякол — следовые количества — для индукции лакказы) с добавлением опилок 7 г/л. В жидкой питательной среде культивировали в течение 35 дней при 28 °С. Измерение активности и концентрации белка проводили в 0, 1, 3, 5 дней и далее через каждые 5 суток.

Определение активности лигнолитических ферментов

Для определения активности ферментов в культуральной жидкости использовали следующую методику.

В процессе культивирования базидиомицетов в жидкой питательной среде проводился отбор 1,5 мл культуральной жидкости из колб через определенные промежутки времени.

Для каждого фермента готовилась реакционная смесь, состоящая из компонентов, указанных в таблице 1, в которой определялась скорость прохождения реакции спектрофотометрическим методом.

Для каждой реакции в течение 5 минут проводили регистрацию зависимости поглощения раствора от времени реакции при длине волны, соответствующей максимуму поглощения продукта данной реакции.

Таблица 1

Состав реакционной среды и характеристики продуктов реакции

Фермент	Компоненты реакционной среды		Спектральные характеристики продукта реакции	
	Буферный раствор	Субстраты	λ_{max} поглощения, нм	$\varepsilon, \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
Лигнинпероксидаза	2,3 мл Na-ацетатного буфера + 3 мл среды культивирования	0,3 мл 10мМ H_2O_2 0,1 мл 40 мМ АВТS	436	36000
Лакказа	2,4 мл Na-цитратного буфера + 3мл среды культивирования	0,3 мл 10 мМ пирокатахина	410	740
Марганец-пероксидаза	2,4 мл K-тартратного буфера + 3 мл среды культивирования	0,3 мл 10мМ H_2O_2	238	7500

Для определения активности ферментов к начальным участкам кривых накопления продуктов строили касательные и рассчитывали активность ферментов по формуле (1):

$$\text{Активность} = \frac{dP}{dt} = \frac{dD \cdot \lambda_{\max}}{\varepsilon \cdot l \cdot dt} \quad (1),$$

где $dD \cdot \lambda_{\max}$ — изменение поглощения раствора при длине волны, соответствующей максимуму поглощения продукта в единицу времени;

ε — коэффициент экстинкции [$M^{-1} \text{cm}^{-1}$];

l — толщина кюветы [см].

За единицу активности ферментов принимали количество фермента, при котором образуется 1 мкМ продукта за 1 мин в пересчете на 1 мл среды культивирования.

Удельная активность ферментов рассчитывалась на 1 мг белка. При этом концентрацию его определяли с помощью постановки биуретовой реакции. Измерение проводили на сканирующем кюветном спектрофотометре SmartSpec™ Plus [6].

Также измеряли активность ферментов культуры мицелия, выращенного на плотной питательной среде. На 4–5-е сутки культивирования на агаре с квасным суслом вырезали среду с мицелием 1×1 см, образец растирали в ступке, добавив 0,01 М К-фосфатный буферный раствор. Данную суспензию профильтровывали через бумажный фильтр, после чего проводили измерения активности и концентрации описанными выше методами.

Обработка результатов

Так как эксперимент осуществлялся в трех повторностях, проводили обработку результатов. Необходимо было получить доверительный интервал среднего значения серии измерений. Изначально находили среднее арифметическое значение (2):

$$x' = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} \quad (2),$$

где x_i — значение эксперимента;

n — число повторностей.

Далее рассчитывали среднюю квадратичную ошибку (3):

$$\sigma_{cp} = \frac{\sqrt{\sum (x' - x_i)^2}}{n(n-1)} \quad (3)$$

В строгом научном эксперименте принято добиваться не менее чем 95% достоверности; поэтому, исходя из числа повторностей и требуемой достоверности ($p=95\%$), определяли коэффициент Стьюдента: $\alpha=4,30$ (табличное значение).

Далее определяли доверительный интервал (4):

$$\Delta x_{\text{дов}} = \pm \alpha \sigma_{cp} \quad (4)$$

Результат экспериментальной серии измерений выражается так (5):

$$X = \bar{X} \pm \alpha \sigma_{cp} \quad (5)$$

Расчеты проводили в программе Microsoft Office Excel, в которой по полученным конечным значениям активностей в сериях измерений были построены графики изменения активности ферментов.

Результаты и обсуждение

На основании анализа литературы [2, 3, 5, 8] и с учетом доступности были выбраны следующие стимуляторы: арахидоновая кислота, экстракт коры дуба, перфторуглеродные соединения и кожура мандарина.

В ходе проведения экспериментов исследовали степень их влияния на секрецию ферментов лигнолитического комплекса культурой базидиомицета. Определялось изменение значений активности ферментов при культивировании в жидкой минеральной питательной среде с добавлением опилок и стимуляторов роста: арахидоновая кислота добавлялась в концентрации 5×10^{-8} г/л [5], экстракт коры дуба — 10% [3], ПФД (перфтордекалин) в количестве 2% от объема питательной среды [2], кожура мандарина — 40 г/л [8]. Кожура мандарина добавлялась в среду в высушенном виде (размер частиц $< 1 \text{ мм}^3$) [8].

Активность определяли спектрофотометрически по скорости образования продуктов реакции. Результаты представлены на рисунках 1, 2 и 3.

Изучение динамики активности лигнинпероксидазы (LiP) показало, что активность этого фермента в день посева на жидкую культуру (0 сутки) не равно нулю; это связано с тем, что грибы высеваются в жидкую культуру с плотной среды. Поэтому анализировался лизат культуры гриба за сутки до посева на жидкую культуру (-1 сутки); в данном случае наблюдалась высокая активность фермента в лизате мицелия. Из этого можно заключить, что и в твердой среде без содержания в ней лигноцеллюлозного субстрата мицелий гриба синтезирует и накапливает лигнинпероксидазу. Пересев на жидкую среду без содержания в ней лигноцеллюлозного субстрата вызывает секрецию фермента, но снижение активности в день посева; по всей видимости, это связано с разведением культуры и требует более активных исследований.

При анализе активности лигнинпероксидазы в процессе культивирования в жидкой среде с лигнинцеллюлозным субстратом без добавления стимуляторов роста

наблюдается два пика: один — на 10-е сутки, а второй, менее выраженный, — на 20-е сутки. Арахидоновая кислота вызывает изменение формы графика, нарастание активности происходит медленнее и достигает максимума только на 15-е сутки, но и снижение активности фермента в культуре также происходит медленно. Можно предположить, что арахидоновая кислота вызывает увеличение синтеза фермента, но увеличивает скорость секреции, именно поэтому активность фермента в среде увеличивается медленнее, так как секретируется большее количество фермента. Добавление в среду экстракта коры дуба также вызывает два пика активности фермента на 10-е и на 25-е сутки. Секреция фермента на первом этапе только увеличивает количество секретируемого фермента.

Второй пик активности, наблюдаемый на 20-е сутки, без стимуляторов имеет меньшую активность. Экстракт коры дуба увеличивает количество секретируемого фермента, возможно, поэтому пик активности наблюдается на 25-е сутки культивирования. Перфтордекалин (ПФД) действует аналогично экстракту коры дуба, также стимулируя два пика активности на 10- и 25-е сутки, но значительно сильнее, чем кора дуба; результат представлен в таблице 2. Кожура мандарина также стимулирует активность фермента, причем наблюдаются два максимума на 10- и 25-е сутки, но снижение активности между пиками невелико; поэтому можно говорить о частичном слиянии пиков или об увеличении ширины пика за счет слияния двух пиков.

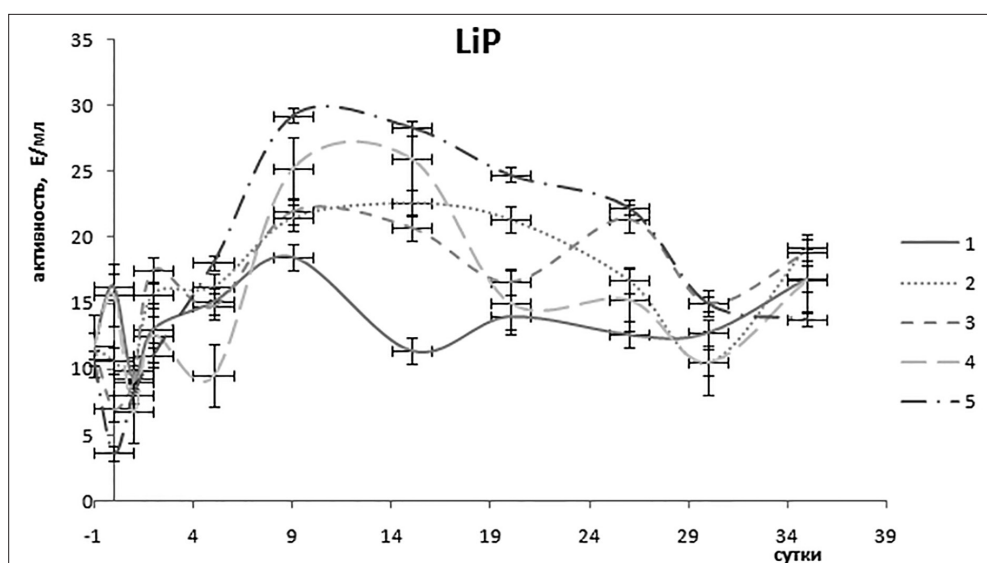


Рис. 1. Изменение активности LiP *Trametes gibbosa* в зависимости от стимулятора: 1 — контроль, 2 — арахидоновая кислота, 3 — экстракт коры дуба, 4 — ПФД, 5 — кожура мандарина; на графиках в точках указаны доверительные интервалы значений активности

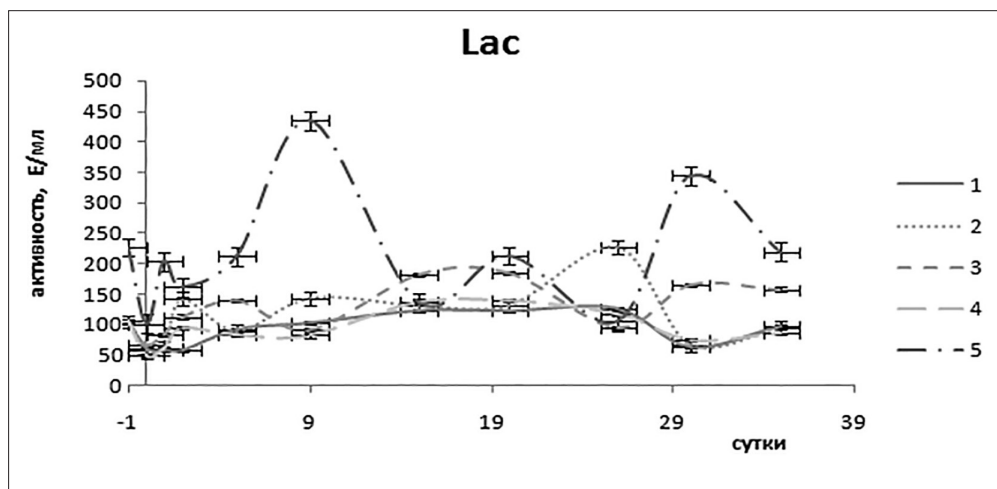


Рис. 2. Изменение активности Lac *Trametes gibbosa* в зависимости от стимулятора: 1 — контроль, 2 — арахидоновая кислота, 3 — экстракт коры дуба, 4 — ПФД, 5 — кожура мандарина; на графиках в точках указаны доверительные интервалы значений активности

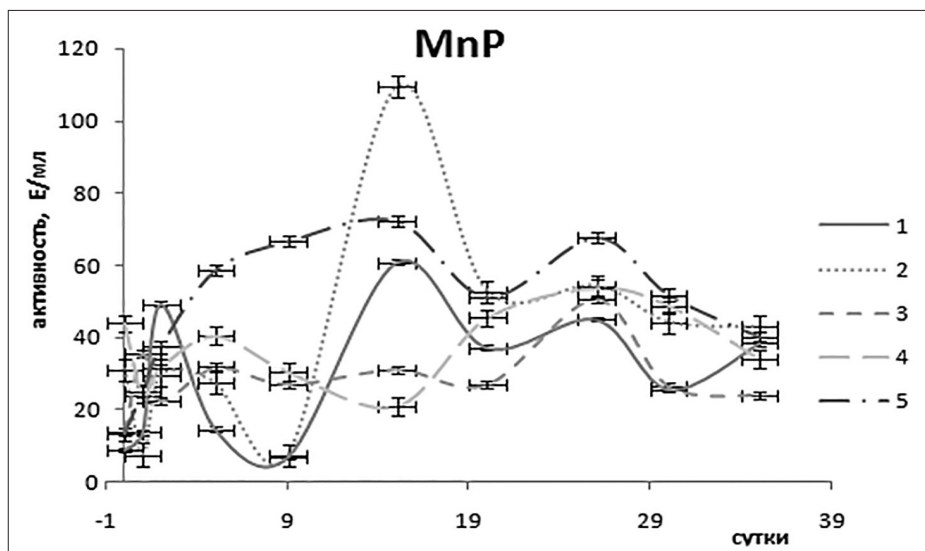


Рис. 3. Изменение активности MnP *Trametes gibbosa* в зависимости от стимулятора: 1 — контроль, 2 — арахидоновая кислота, 3 — экстракт коры дуба, 4 — ПФД, 5 — кожура мандарина; на графиках в точках указаны доверительные интервалы значений активности

Следовательно, экстракт коры дуба и ПФД не влияют на скорость синтеза лигнинпероксидазы, тогда как арахидоновая кислота и кожура мандарина увеличивают время максимальной секреции лигнинпероксидазы, увеличивая время, оптимальное для выделения фермента. Кроме того, кожура мандарина значительно увеличивает интенсивность секреции.

Изучение динамики активности лакказы так же, как и лигнинпероксидазы, показало наличие активности фермента в день посева (0 сутки), и поэтому была проанализирована активность данного фермента за сутки до посева (-1 сутки) и также наблюдалась достаточно высокая активность. Накопление лакказы и лигнинпероксидазы в мицелии гриба, растущего на плотной среде даже без лигниноцеллюлозного субстрата, позволяет предположить, что именно эти два фермента участвуют в разложении древесины на начальных этапах роста мицелия. Изменение активности в день посева также, возможно, связано с разведением культуры при пересеве. Активность лакказы при культивировании без стимуляторов роста происходит медленно, без выраженных пиков, до 25-х суток, а затем также снижается. Арахидоновая кислота, экстракт коры дуба и кожура мандарина, внесенные по отдельности, стимулируют синтез лакказы с ярко выраженными тремя пиками активности фермента. Арахидоновая кислота стимулирует процесс синтеза, именно поэтому пики активности наблюдаются на 2- и 9-е сутки. Кожура мандарина и экстракт коры дуба также стимулируют процесс синтеза. Первый пик при воздействии этих стимуляторов наблюдается на пятые сутки, а вот на втором этапе более активное увеличение

скорости синтеза обеспечивает кожура мандарина, так как пик активности наблюдается на 9-е сутки, а не на 15-е, как в присутствии экстракта коры дуба. ПФД, наоборот, замедляет процесс секреции лакказы, так как первый пик активности наблюдается только на 15-е сутки.

Таким образом, экстракт коры дуба, арахидоновая кислота и кожура мандарина вызывают увеличение скорости синтеза лакказы, причем кожура мандарина увеличивает не только скорость, но и количество синтезируемого фермента.

Анализ динамики активности марганец-пероксидазы показал, что за сутки до посева активность этого фермента не наблюдается, но в момент посева активность выявляется. Это позволяет говорить о том, что фермент начинает синтезироваться позже лигнинпероксидазы и лакказы.

Динамика изменения активности марганец-пероксидазы (MnP) без добавления стимуляторов роста обнаруживает три пика активности на 2-, 15- и 25-е сутки культивирования. Добавление арахидоновой кислоты показывает точно такое же изменение активности, но увеличение активности относительно культуры без стимуляторов роста. Добавление экстракта коры дуба резко увеличивает скорость синтеза марганец-пероксидазы. Так как первый пик активности наблюдается на первые сутки после посева, то, возможно, это связано не только со стимуляцией синтеза, но с культивированием на плотной среде. Второй пик имеет большую активность, хотя наблюдается только на 25-е сутки. Экстракт коры дуба и ПФД уменьшают скорость синтеза марганец-пероксидазы, так как пик активности наблюдается только на 25-е сутки. Добавление кожуры мандарина приводит к

выявлению двух пиков на 15- и 25-е сутки, причем первый пик начинается на 5-е сутки и заканчивается на 15-е сутки, то есть кожура мандарина позволяет увеличить период максимального синтеза марганецпероксидазы во время культивирования.

Следующим этапом исследований является изучение влияния стимуляторов роста в комплексе: арахидоновая кислота и ПФД в первом варианте и экстракт коры дуба и ПФД — во втором. Вещества добавляли в тех же концентрациях, как и в предыдущем опыте, при раздельном их внесении, но здесь изучалось их совместное воздействие. В одном случае в среду добавляли ПФД

(2%) с арахидоновой кислотой (5×10^{-8} г/л), в другом ПФД (2%) — с экстрактом коры дуба (10%).

При использовании стимуляторов роста в комплексе наибольшее воздействие оказывает комплекс из экстракта коры дуба и ПФД. Этот комплекс увеличивает скорость увеличения активности фермента в культуре, так как первый пик наблюдается на вторые сутки, а второй — на девятые. Комплекс из арахидоновой кислоты и ПФД стимулирует пик активности на 10- и 25-е сутки; действие комплекса хуже, чем воздействие мандариновой кожуры, действие которой увеличивает период, когда интенсивность синтеза фермента значительно выше контрольной.

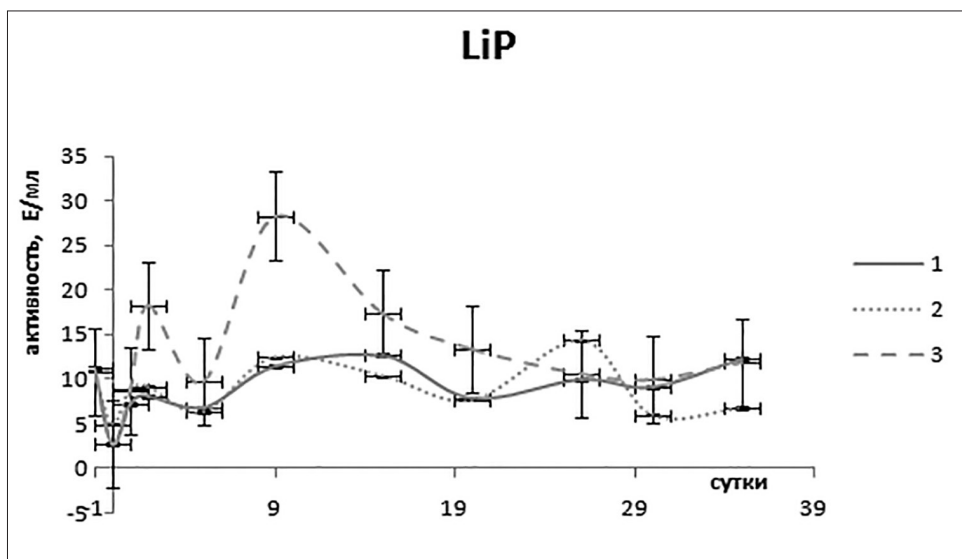


Рис. 4. Изменение активности LiP *Trametes gibbosa* в зависимости от стимуляторов: 1 — контроль, 2 — арахидоновая кислота+ПФД, 3 — экстракт коры дуба+ПФД; на графиках в точках указаны доверительные интервалы значений активности

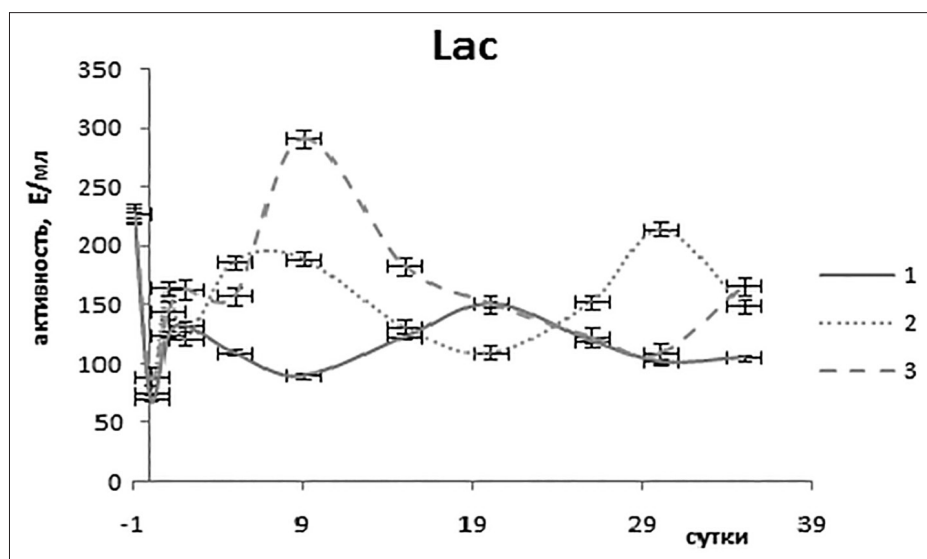


Рис. 5. Изменение активности Lac *Trametes gibbosa* в зависимости от стимуляторов: 1 — контроль, 2 — арахидоновая кислота+ПФД, 3 — экстракт коры дуба+ПФД; на графиках в точках указаны доверительные интервалы значений активности

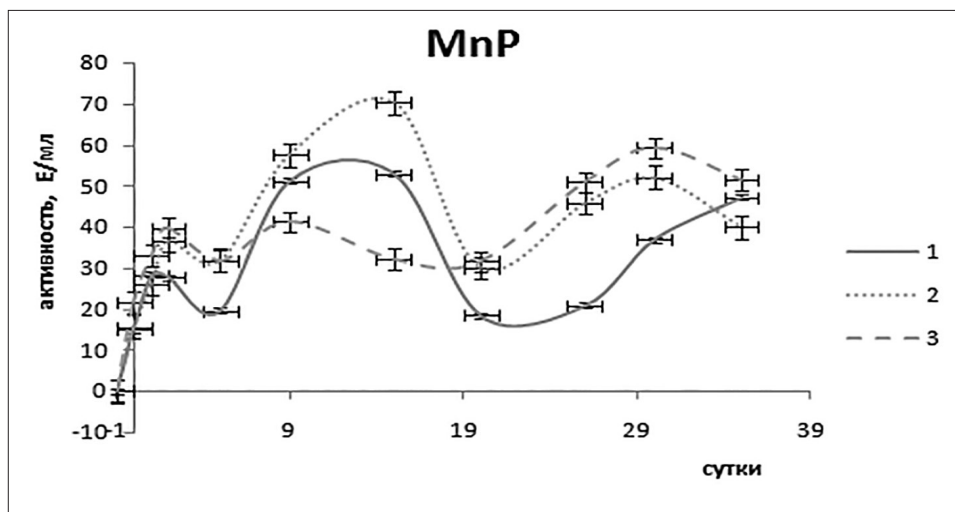


Рис. 6. Изменение активности MnP *Trametes gibbosa* в зависимости от стимуляторов: 1 — контроль, 2 — арахидоновая кислота+ПФД, 3 — экстракт коры дуба+ПФД; на графиках в точках указаны доверительные интервалы значений активности

Арахидоновая кислота в комплексе с ПФД усиливает синтез лакказы, но в результате скорость увеличения активности фермента в культуральной жидкости снижается и достигает пика только на 10-е сутки культивирования, причем активность сопоставима с контролем, в котором пик активности лакказы наблюдается на 20-е сутки. Экстракт коры дуба в комплексе с ПФД действует так же, как и комплекс арахидоновая кислота и ПФД, но с корой дуба и ПФД активность фермента выше.

Комплексное внесение арахидоновой кислоты и ПФД не ускоряет синтез марганец-пероксидазы; первые два пика активности фермента совпадают с контрольным образцом, максимальная активность наблюдается на вторые и затем 10–15-е сутки. Затем активность фермента в культуральной жидкости снижается, но при добавлении арахидоновой кислоты вместе с ПФД снова начинает нарастать, достигая еще одного максимума на 30-е сутки, чего не происходит в контроле. Культивирование мицелия с экстрактом коры дуба совместно с ПФД слегка увеличивает скорость нарастания активности марганец-пероксидазы. Первый пик проявляется на 10-е, а не на 15-е сутки культивирования, активность фермента ниже контрольной, наибольшая активность марганец-пероксидазы при культивировании с экстрактом коры дуба и ПФД наблюдается только на 30-е сутки культивирования.

Поэтому можно заключить, что совместное использование стимуляторов роста вызывает увеличение количества секретируемых ферментов. Добавление в среду комплекса экстракта коры дуба и ПФД увеличивает скорость накопления в культуральной жидкости лигнинпероксидазы и лакказы, не влияя на скорость синтеза марганец-пероксидазы.

Также исследовали влияние стимуляторов (арахидоновая кислота, экстракт коры дуба, ПФД) при их совместном внесении в среду культивирования.

Динамика нарастания активности лигнинпероксидазы при совместном использовании всех трех стимуляторов роста не привела к увеличению скорости накопления фермента, пики активности наблюдаются в те же сутки культивирования, что и в контрольных образцах, но вызывают увеличение активности относительно контроля

Культивирование мицелия со всеми тремя стимуляторами роста сначала не влияет на скорость накопления лакказы, первый пик активности наблюдается на 5-е сутки культивирования в контрольном и опытном образцах. Второй пик активности наблюдается на 15-е сутки культивирования, в отличие от контроля, в котором второй пик детектируется на 20-е сутки. Причем, несмотря на то, что в опытном образце отмечается спад активности лакказы, она выше, чем в контроле. Кроме того, при культивировании с тремя стимуляторами выявляется третий пик активности на 25-е сутки. Можно заключить, что все три стимулятора в комплексе, во-первых, ускоряют накопление лакказы в культуральной жидкости, во-вторых, увеличивают период активного синтеза лакказы.

Культивирование со всеми тремя стимуляторами роста увеличивает скорость накопления марганец-пероксидазы, первые два пика выявляются на 5- и 10-е сутки, причем в контрольном образце первый пик обнаруживается только на 20-е сутки. Кроме того, стимуляторы обеспечивают рост активности марганец-пероксидазы после второго пика, начинается дальнейшее накопление фермента в культуральной жидкости и появление третьего пика активности, детектируемого на 25-е сутки.

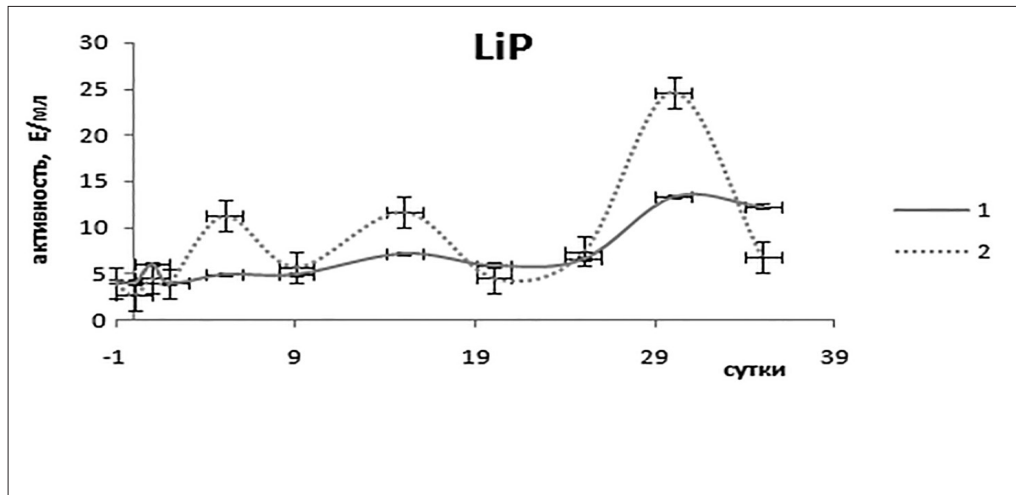


Рис. 7. Изменение активности LiP *Trametes gibbosa* в зависимости от стимуляторов: 1 — контроль, 2 — арахидоновая кислота+ПФД+экстракт коры дуба; на графиках в точках указаны доверительные интервалы значений активности

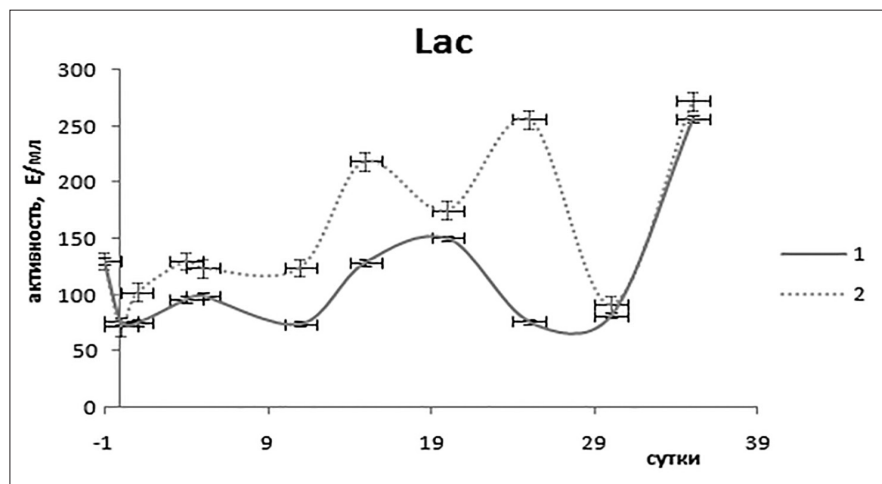


Рис. 8. Изменение активности Lac *Trametes gibbosa* в зависимости от стимуляторов: 1 — контроль, 2 — арахидоновая кислота+ПФД+экстракт коры дуба; на графиках в точках указаны доверительные интервалы значений активности

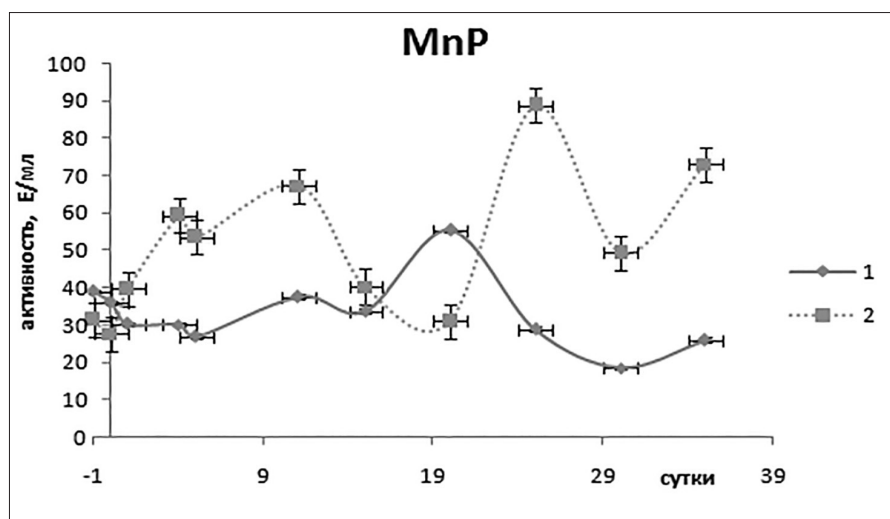


Рис. 9. Изменение активности MnP *Trametes gibbosa* в зависимости от стимуляторов: 1 — контроль, 2 — арахидоновая кислота+ПФД+экстракт коры дуба; на графиках в точках указаны доверительные интервалы значений активности

Итак, комплексное добавление стимуляторов роста в среду культивирования увеличивает скорость накопления марганец-пероксидазы и незначительное ускорение синтеза лакказы, не влияя на скорость синтеза лигнинпероксидазы. Все стимуляторы роста по отдельности и в сочетаниях вызывают изменение активности ферментов относительно контроля, стимулируя синтез ферментов лигнолитического комплекса. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Максимальные значения активности ферментов, наблюдаемые за весь период культивирования со стимуляторами роста и их сочетаниями

Образец	Максимальное значение активности фермента, Е/мл		
	LiP	Lac	MnP
Контроль	18,45±2,1	126,17±2,69	60,91±3,7
Арахидоновая кислота	22,62±1,27	226,55±6,42	109,32±3,05
Экстракт коры дуба	22,04±1,83	183,04±3,75	50,75±3,87
ПФД	25,99±2,4	139,34±3,24	53,62±2,4
Кожура мандарина	29,234±0,57	434,39±2,45	67,71±1,65
Арахидоновая кислота+ПФД	14,32±0,101	189,25±6,01	59,205±2,83
Экстракт коры дуба+ПФД	28,32±4,9	290,84±8,1	59,209±2,54
Арахидоновая кислота+ПФД +экстракт коры дуба	24,58±1,65	256,08±2,31	88,67±4,6

В таблице 2 указаны максимальные удельные активности ферментов с доверительным интервалом значений с 95% вероятностью.

При анализе максимальной активности ферментов в присутствии стимуляторов наибольшая активность лигнинпероксидазы наблюдается при культивировании с кожурой мандарина, активность превышает контроль в 1,6 раза. Причем, эта активность достигается на 10-е сутки культивирования, при этом пик активности растягивается с 10-х суток до 25-х суток, что позволяет использовать кожуру мандарина как активный стимулятор синтеза лигнинпероксидазы. Сходная активность лигнинпероксидазы выявляется при культивировании мицелия в среде с экстрактом коры дуба и ПФД, наблюдаемая активность в 1,5 раза превышает активность в контроле,

и этот пик активности также отмечается на 10-е сутки, но не растянут как при культивировании кожурой мандарина. Все остальные стимуляторы роста и их сочетания незначительно усиливают синтез лигнинпероксидазы, за исключением комплекса арахидоновая кислота и ПФД, который, наоборот, несколько подавляет синтез фермента лигнинпероксидазы.

На активность лакказы кожура мандарина также действует как активный стимулятор синтеза фермента, максимальная активность этого фермента в 3,4 раза превышает активность в контроле, скорость синтеза при этом увеличивается под действием данного стимулятора роста, но период максимальной активности фермента не увеличивается. Кора дуба вместе с ПФД также заметно увеличивают накопление лакказы в культуральной жидкости, максимум активности лакказы превышает значения в контрольном образце в 2,3 раза. Все остальные стимуляторы аналогично увеличивают активность синтеза лакказы.

На активность марганец-пероксидазы наиболее активно влияет арахидоновая кислота, максимум активности при ее использовании в 1,8 раза превышает данные в контрольном образце, но вызывает ускорение накопления фермента; причем кожура мандарина незначительно увеличивает интенсивность и скорость синтеза, а также расширяет период максимально активного синтеза марганец-пероксидазы. Совместное культивирование с ПФД, арахидоновой кислотой и экстрактом коры дуба тоже значительно увеличивает накопление марганец-пероксидазы в культуральной жидкости, максимум активности в 1,5 раза превышает данные относительно контрольного образца. При этом наблюдается увеличение скорости накопления фермента в культуре мицелия. Все остальные регуляторы роста и их сочетания не влияют на рост синтеза фермента или подавляют его синтез как экстракт коры дуба.

Заключение

Лигнинпероксидаза и лакказа активно синтезируются на плотной среде в отсутствие лигнинсодержащих субстратов. Кожура мандарина увеличивает скорость и интенсивность синтеза лакказы и лигнин пероксидазы. Экстракт коры дуба в комплексе с ПФД оказывает сходное, но более слабое воздействие. Арахидоновая кислота значительно увеличивает интенсивность синтеза марганец-пероксидазы, тогда как воздействие ПФД, экстракта коры дуба и арахидоновой кислоты также увеличивает интенсивность и скорость синтеза марганец-пероксидазы. Анализ воздействия кожуры мандарина на синтез марга-

нец-пероксидазы позволяет предполагать перспективность использования этого стимулятора, который незначительно увеличивает количество синтезируемого фермента, скорость нарастания активности в культуральной жидкости и время максимальной секреции фермента.

Таким образом, используя разные стимуляторы роста, можно получать наибольшее количество разных ферментов лигнолитического комплекса и обеспечить их дифференцированный синтез.

Литература

1. Акулов Б.В. Обработка и переработка целлюлозы, бумаги и картона: Учеб. пособие. — Пермь, ПГТУ, 2008. — 36 с.
2. Бакулин М.К., Дармов И.В., Чеботарев Е.В., Кучеренко А.С., Бакулина Л.В., Кривошеина Н.А. Влияние перфторорганических соединений на рост и развитие бактерий и микромицетов / Перфторуглеродные соединения в медицине и биологии. Сборник материалов XIII Международной конференции. — Пуцдино, 2004.
3. Калашников А.А. Новая технология культивирования базидиомицетов в искусственно замкнутой экосистеме: автореф. дис. канд. биол. наук. — Саратов, 2011. — 23 с.
4. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология. 3-е изд., испр. — М.: 2009. — 352 с.
5. Пат. 2409568 Российская Федерация С12N1/14 Посевной мицелий базидиомицета и способ его приготовления /Краснопольская Л.М., Леонтьева М.И., Автономова А.В.; заявитель и патентообладатель «ОАО» Завод экологической техники и экопитания «ДИОД»; заявл. 10.12.2009; опубл. 20.01.2011
6. Практикум по биохимии: учеб. пособие / Под ред. О.А. Петрова, С.Г. Пуховской. — Иваново.: ГОУ ВПО Ивановский государственный химико-технологический университет, 2006. — 509 с.
7. Состав органических веществ растительных субстратов [Электронный ресурс]. http://wer23sd.narod.ru/_2.htm.
8. Overproduction of lignolytic enzymes. Vladimir Elisashvili, Eva Kachlishvili, Tamas Torok. Patent. Tbilisi. — 2012. — 10 p.

Список сокращений:

ПФД — перфтордекалин;

LiP — лигнинпероксидаза;

Lac — лакказа;

MnP — марганец-пероксидаза.

EVALUATION OF THE EFFECT OF GROWTH FACTORS ON THE DYNAMICS OF THE FORMATION OF ENZYMES LIGNOLYTIC TRAMETES GIBBOSA

E.E. KHABIBULINA, A.S. BELYANIN, E.A. BESSOLITSYNA, I.V. DARMOV

Vyatka State University, Kirov

The paper studied the effect of growth promoters on the secretion of enzymes in the complex lignolytic *Trametes gibbosa*. It was found that by making growth factors into the culture medium an increase in the specific activity of the enzymes studied was revealed. It was shown that tangerine peel significantly increased the speed and intensity of lignin synthesis laccase in 1.6 and 3.4 times, respectively, and the speed and intensity of synthesis increased the manganese peroxidase-cultivation in the presence of arachidonic acid in 1.8 times.

Keywords: basidiomycetes, laccase, lignin, manganese peroxidase, growth stimulator.

ОЦЕНКА СЫРЬЕВОЙ БАЗЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ТОПЛИВА И ЭНЕРГИИ ИЗ БИОМАССЫ

З.Б. НАМСАРАЕВ^{1,2*}, П.М. ГОТОВЦЕВ¹, А.В. КОМОВА¹,
А.В. БОРГОЛОВ¹, Я.Э. СЕРГЕЕВА¹, Р.Г. ВАСИЛОВ¹

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,

² Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва

В обзоре проведена предварительная оценка биоэнергетического потенциала России. Он составил 3038 ПДж (3 ЭДж) или 103686 тыс. т у.т. (по состоянию на 2011 год). При этом доля растительных отходов агропромышленного комплекса составила 41% от суммарного потенциала, отходов животноводства — 20%, отходов лесопромышленного комплекса — 16%, твердых коммунальных (бытовых) отходов — 23%. Учитывая оценки мирового биоэнергетического потенциала в диапазоне от 64 до 161 ЭДж, доля России в нем составляет от 1,8 до 4,6%.

Ключевые слова: биотехнология, биотопливо, биомасса, сырьевая база.

Введение

Россия обладает крупнейшими ресурсами биомассы в мире. По площади лесов она занимает первое место в мире (809 млн га по состоянию на 2010 год, 20% от площади лесов мира) [14]. По площади пахотных земель Россия занимает третье место в мире (121 млн га по состоянию на 2008 год, 8,8% от площади мировых пахотных земель) [23]. Благодаря этому вопрос корректной оценки российских биоэнергетических ресурсов привлекает значительный интерес со стороны российских и зарубежных исследователей [21, 25, 27–29].

Ранее общая оценка российских ресурсов биомассы для производства тепла и энергии проводилась с использованием данных, полученных в начале 2000-х годов [16]. В более позднее время проводились оценки биоэнергетического потенциала по отдельным видам сырья [6, 17], но интегральных оценок биоэнергетического потенциала России в последние годы не проводилось. Подобная оценка особенно актуальна сейчас, так как в середине 2000-х годов резко увеличилось производство продуктов сельского хозяйства, что обусловило большую доступность биомассы и изменило соотношение различных типов биоэнергетических ресурсов. Целью данной статьи является анализ современной сырьевой

базы Российской Федерации для производства топлива и энергии из биомассы.

Сырьевая база агропромышленного комплекса

Российская Федерация является одним из крупнейших мировых производителей и экспортеров продукции сельского хозяйства. В 2013 году производство зерновых в России составило 92,4 млн тонн. Внутреннее потребление составило 66,7 млн тонн, тогда как экспорт составил 26 млн тонн. Это позволило России занять 5-е место в мире по объему производства зерновых культур и 6-е место в рейтинге крупнейших стран-экспортеров зерна [5]. Производство растительных масел из масличных культур в России в 2013 году составило около 4 млн тонн. Из этого количества 90% составило масло подсолнечника, по производству которого в 2013 году Россия заняла 1-е место в мире [22].

По данным Центра агропродовольственной политики РАНХиГС, по ряду ключевых продуктов растениеводства пороговые значения показателей продовольственной независимости уже превышены. По зерну в 2013 г. фактическое значение составляет 128,9% при пороговом значении 95%, по растительному маслу — 132,6% против 80%, по сахару — 82,3%, против 80%. Общий уровень продовольственной независимости России в 2013 году составил 88%. Отмечается, что по зерну и растительному маслу Россия обеспечивает не только собственное население, но и около 50 млн человек из других стран мира [18].

© 2015 г. Намсараев З.Б., Готовцев П.М., Комова А.В., Борголов А.В., Сергеева Я.Э., Василов Р.Г.

* Автор для переписки:

Намсараев Зоригто Баирович

НИЦ «Курчатовский институт»

123182 Москва, пл. Академика Курчатова, 1

Россия обладает наибольшим в мире потенциалом по наращиванию производства сельхозпродукции. На начало 2014 года 37 млн га пахотных земель в России не использовалось, что составляет 32% от общей площади пашни. Общая площадь пашни составила 115 млн га, тогда как посевная площадь в 2013 году — 78 млн га [10]. Кроме использования заброшенных земель, повышение объемов производства может быть достигнуто и за счет использования более современных методов культивирования. Так, например, урожайность пшеницы в России ниже, чем в Германии в 3–4 раза. По оценкам Schierhorn et al. [30], при повышении объемов внесения удобрений и оптимальном орошении урожай пшеницы в Европейской части России, где выращивается около 75% российской пшеницы, может быть увеличен на 9–32 млн тонн. Для сравнения: в 2013 году производство пшеницы в России составило 52 млн тонн.

Развитие российского сельского хозяйства в 2000-х годах привело к тому, что в 2012 году выручка от экспорта продовольственных товаров и сельскохозяйственного сырья составила 16,7 млрд долларов, что превышает стоимость экспорта вооружений из России [13]. Дальнейшее наращивание экспорта осложняется пропускной способностью портов для отгрузки зерна (Новороссийск, Ростов-на-Дону, Находка и др.), а также высокими тарифами на перевозку зерна из регионов, отдаленных от портов (в основном Южная Сибирь и Дальний Восток) [1]. В этих условиях наиболее перспективным направлением является использование зерна в качестве кормов в животноводстве, а также повышение степени его переработки с получением продуктов с высокой добавленной стоимостью, а также тепла и энергии [27].

Оценка современного энергетического потенциала растительных отходов сельского хозяйства (соломы, лузги, стеблей и др.) была проведена Касьяновым А.С. [6]. В результате обработки статистических данных по валовому сбору зерна и соломы в различных областях РФ были определены коэффициенты отходов ($K_{от}$, выход соломы и стеблей растений в зависимости от количества зерна), коэффициент потерь ($K_{п}$) и коэффициент энергетического использования растительных отходов ($K_{эн}$, объем отходов, который может использоваться как топливо) (табл. 1). Энергетический потенциал рассчитывался для воздушно-сухой биомассы влажностью 18–20% (табл. 2). Согласно полученным данным, количество отходов по состоянию на 2011 год составило 974715,9 тысяч центнеров, а их энергетический потенциал — 1266 ПДж или 43213,9 тыс. т у.т.

Таблица 1

Коэффициенты основных растительных отходов (Касьянов, 2014) [6]

Наименование культуры и отходов	Коэффициент отходов ($K_{от}$)	Коэффициент потерь ($K_{п}$)	Коэффициент энергетического использования ($K_{эн}$)
Солома зерновых и зернобобовых	1	0,1	0,7
Солома рапса	1,8	0,1	1
Солома сои	1,3	0,1	1
Кукуруза (стебли)	1,2	0,25	1
Подсолнечник (стебли)	3,5	0,3	1
Подсолнечник (лузга)	0,18	0,1	1

Таблица 2

Количество основных растительных отходов в 2011 г. (Касьянов, 2014) [6]

	Валовой сбор зерна ($B_{зер}$), тыс. ц	Количество растительных отходов ($B_{эн}$), тыс. ц	Количество условного топлива, тыс. т у.т.
Зерновые и зернобобовые	976021	614893,2 (солома)	26352,6
Рапс	3099	5020,4 (солома)	262,5
Соя	18189	21281,1 (солома)	1155,3
Кукуруза	74477	67029,3 (стебли)	3131,2
Подсолнечник на зерно	102026	249963,7 (стебли)	11426,9
Подсолнечник на зерно	—	16528,2 (лузга)	885,4
Всего	1173812	974715,9	43213,9

По данным Минсельхоза России, в 2011 году поголовье скота и птицы составило 20,1 млн голов крупного рогатого скота, свиней — 20 млн голов, птицы — 473,1 млн голов [10]. Количество навоза и помета, рассчитанное по методическим рекомендациям Министерства сельского хозяйства РФ, по состоянию на 2011 год во влажном виде составляют 231 млн тонн в год [9]. Оценка биоэнергетического потенциала отходов животноводства проводилась по усредненным коэффициентам, полученным во время исследования, осуществленного в Липецкой области [19]. По нашим оценкам, суммарный потенциал отходов российского животноводства составляет около 599 ПДж или 20453 тыс. т у.т. (табл. 3).

Таблица 3

Количество отходов животноводства в 2011 г.

	Поголовье в 2011 году, тыс. голов	Навоз и помет, тыс. т/год	Количество условного топлива, тыс. т у.т.
КРС – всего,	20134	170991	11114
в том числе коровы	8988		
Свиньи	17258	27613	2181
Птица	473400	33138	7158
Итого		231742	20453

Незначительные объемы переработки отходов животноводства представляют серьезную проблему для сельского хозяйства и экологии, так как низкая вместимость навозохранилищ, а также отсутствие у ряда хозяйств сельскохозяйственных угодий приводит к тому, что в большинстве хозяйств объемы навоза превышают объемы навозохранилищ в 1,5–2 и более раз. В результате хозяйства вынуждены размещать навоз на неподготовленных площадках, где он загрязняет водоемы и земли вокруг навозохранилищ. В перспективе поголовье скота в сельскохозяйственных организациях будет постоянно возрастать и, следовательно, будет увеличиваться количество получаемого навоза и помета [11].

Приблизительная оценка суммарного энергетического потенциала отходов основных отраслей АПК России по состоянию на 2011 год составляет 63 млн т у.т. или 1846 ПДж. Из них потенциал отходов растениеводства составляет 1266 ПДж, отходов животноводства – 599 ПДж.

Сырьевая база лесопромышленного комплекса

По данным Рослесхоза, теоретически рассчитанный допустимый ежегодный объем изъятия древесины (расчетная лесосека) в 2008–2014 годах составлял 635–700 млн м³ в год. Из них в 2008 году в экономически доступной зоне было 367 млн м³, а в экономически невыгодной зоне – 268 млн м³. Реальный объем заготовок древесины за этот период составил 176–202,8 млн м³ в год. Таким образом, по данным Рослесхоза, в России есть дополнительный потенциал лесных ресурсов в экономически доступной зоне объемом 180 млн м³ в год.

Альтернативная точка зрения на доступность лесных ресурсов заключается в том, что в настоящее время в нашей стране имеется не избыток, а дефицит лесных

ресурсов из-за истощения наиболее доступных и удобных для лесопользования лесов. В 1940–2000 годах произошла деградация наиболее ценной лесосырьевой базы в староосвоенных регионах Европейской части России и их замена вторичными малоценными мелколиственными и смешанными лесами, что приводит к вымиранию поселений этих регионов из-за истощения лесной базы [4, 12, 15].

В этих условиях более глубокая переработка продуктов лесного хозяйства, а также включение в хозяйственный оборот отходов лесного комплекса становятся реальной возможностью для развития регионов, поскольку биоэнергетическая отрасль значительно менее требовательна к качеству лесных ресурсов.

По оценкам Левина [8], сырьевой потенциал древесного топлива, полученного из отходов лесного комплекса, в 2011 году составил 75 млн м³, энергетический потенциал составил 473,66 ПДж или 16163 тыс. т у.т. Расчеты проведены на основании данных Рослесхоза об объеме заготовленной древесины 196,7 млн м³ и данных Росстата об объеме необработанной древесины 111,5 млн м³. Также при расчете были проведены оценки объемов заготовки дровяной древесины и тонкомера (жерди и колья), коры, биомассы ветвей и сучьев кроны, отходов производства пиломатериалов, строительных конструкций, бумаги, целлюлозы, щепы технологической и т.д. Средняя плотность древесины была рассчитана как средневзвешенное значение плотностей древесины различных пород и принята за 900 кг/м³. Учитывая, что большая часть отходов, пригодных для энергетического использования, образуется при рубках леса и на первичных стадиях переработки древесины, то средняя влажность древесины, пригодной для энергетического использования, была равна влажности свежесрубленной древесины 55%, а низшая теплота сгорания была принята в 7,0 ГДж/т [8].

Сырьевая база твердых коммунальных (бытовых) отходов (ТКО)

Ежегодно в России образуется свыше 60 млн тонн твердых коммунальных (бытовых) отходов, что составляет около 400 кг отходов на 1 человека в год. Из них только 7–8% возвращается в хозяйственный оборот. Низкий процент использования ТКО связан с недостаточным развитием инфраструктуры: в настоящее время в России функционирует 243 комплекса по

утилизации отходов, 53 комплекса по сортировке отходов, около 40 мусоросжигающих заводов. Преобладающим способом обращения с отходами ТКО является захоронение, которое проводится с множественными нарушениями экологических и санитарно-эпидемиологических требований. При этом безвозвратно теряются материальные и энергетические ресурсы, которые могут быть повторно использованы. Кроме того, произошел скачкообразный рост потребления населением продукции, которая после утраты своих потребительских свойств относится к ТКО, а также увеличение количества высококалорийных отходов, таких как макулатура и полимеры [13]. Оценка современного морфологического состава отходов показала, что значения теплоты сгорания ТКО, полученные в 1987 году, дают значительно заниженные результаты (3,7 МДж/кг) по сравнению с современными данными, учитывающими повышение в несколько раз доли высококалорийных компонентов [3]. При использовании современной оценки теплоты сгорания в 9,24 МДж/кг энергетический потенциал отходов ТКО в России за вычетом доли вовлекаемой в хозяйственный оборот составляет 700 ПДж или 23,9 млн т у.т.

Использование микроводорослей для утилизации выбросов CO₂ и производства биотоплива

Перспективным источником биомассы для производства тепла и энергии являются микроводоросли. Благодаря высокой скорости роста, высокому процентному содержанию липидов, а также возможности использования для выращивания микроводорослей воды и земель, непригодных для сельского хозяйства, микроводоросли рассматриваются как основа для производства биотоплива 3-го поколения. Moody et al. оценили потенциал микроводорослей для производства биотоплива в различных климатических зонах мира и в разных странах [26]. Для этого было проведено моделирование с расчетом зависимости продуктивности микроводорослей от климатических условий. В качестве модельного организма использовалась микроводоросль *Nannochloropsis oceanica*, а валидация модели проводилась на тестовой площадке компании Solix Biosystems в Форт Коллинз, Колорадо, США. Авторами была осуществлена оценка площади непахотных земель (non-arable land по классификации FAO), необходимых для замещения потребляемого транспортного топлива по странам. С учетом скорректированных данных по потреблению Россией транспортного топлива (62 млн тонн в 2011 году) данная

площадь составляет 93 тысячи км², что примерно равно площади Кемеровской области (табл. 4).

Наиболее благоприятными регионами для культивирования микроводорослей являются южные регионы Европейской части России с высоким уровнем инсоляции, которые включают в себя Республику Крым, регионы Северного Кавказа, Краснодарского и Ставропольского краев, Республику Калмыкию и Астраханскую область, где расчетная продуктивность составляет 12,52–13,91 м³/(га год) липидов или 24315–27017 кг/(га год) – 6,66–7,40 г/(м² сут. – биомассы микроводорослей. В следующую по благоприятности зону входят Курская, Белгородская, Воронежская, Волгоградская и Саратовская области, где продуктивность составляет 11,13–12,52 м³/(га год) липидов или 21614–24315 кг/(га год) – 5,92–6,66 г/(м² сут) – биомассы микроводорослей. Для достижения заданного уровня продуктивности в среду для культивирования микроводорослей необходимо поступление углекислого газа. Для этой цели могут быть использованы выбросы ТЭС, при этом одновременно будет решаться задача снижения выбросов углекислого газа в атмосферу [7]. Основным типом сырья для ТЭС южных регионов России является газовое топливо, что значительно упрощает системы утилизации выбросов углекислого газа по сравнению с угольными ТЭС.

При использовании теплоты сгорания биодизельного топлива (стандарта EN14213 [20]), равной 35 МДж/кг при плотности 0,86 г/см³, и теоретического потенциала России по производству биотоплива, составляющего 1880 млн м³, энергетический потенциал составит 56,6 ЭДж, что на порядок превышает потенциал остальных видов биоэнергетических ресурсов.

Суммарный биоэнергетический потенциал России

Таким образом, оценка современного суммарного биоэнергетического потенциала включает в себя следующие направления:

- растительные отходы агропромышленного комплекса – 974715,9 тыс. ц, 1266 ПДж, 43213,9 тыс. т у.т., 41% от суммарного потенциала;
- отходы животноводства – 231 млн тонн, 599 ПДж, 20453 тыс. т у.т., 20%;
- отходы лесопромышленного комплекса – 75 млн м³, 473,66 ПДж, 16163 тыс. т у.т., 16%;
- твердые коммунальные (бытовые) отходы за вычетом отходов, вовлекаемых в хозяйственный оборот, – 55,8 млн тонн, 700 ПДж, 23,9 млн т у.т., 23%.

**Расчет выхода биотоплива
в зависимости от площади непахотных земель**

Продукция липидов, м ³ /га год	Площадь непахотных земель, млн га	Потенциальный объем производства биодизельного топлива, млн м ³ в год	Энергетический потенциал биодизельного топлива, ЭДж в год	Потребление топлива на транспорте, млн м ³ в 2011 году (млн тонн в 2011 году)	Доля непахотных земель для покрытия потребности в транспортном топливе, %
7,8	241	1880	56,6	73 (62)	3,8%

Суммарный биоэнергетический потенциал России по состоянию на 2011 год, включающий в себя вышеперечисленные отрасли, составляет 3038 ПДж (3 ЭДж) или 103686 тыс. т у.т. В связи с тем, что государственная статистика не ведет отдельного учета отходов из биомассы, точная оценка биоэнергетического потенциала России затруднена и является оценочной.

Согласно данным Федеральной службы по надзору в сфере природопользования, опубликованным в виде государственного доклада «О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2011 году», объем отходов, которые, возможно, могут быть отнесены к биомассе, составляет 54,33 млн тонн [2]. Этот объем включает в себя отходы следующих отраслей:

- Сельское хозяйство, охота и лесное хозяйство — 27,47 млн тонн;
- Рыболовство, рыбоводство — 0,07 млн тонн;
- Производство пищевых продуктов, включая напитки, и табака — 16,15 млн тонн;
- Текстильное и швейное производство — 0,28 млн тонн;
- Производство кожи, изделий из кожи и производство обуви — 0,49 млн тонн;
- Обработка древесины и производство изделий из дерева — 3,90 млн тонн;
- Целлюлозно-бумажное производство; издательская и полиграфическая деятельность — 5,97 млн тонн.

При использовании теплоты сгорания ТКО, равной 9,24 МДж/кг, энергетический потенциал учтенных государственной статистикой отраслей составляет 502 ПДж (0,5 ЭДж) или 17133 тыс. т у.т.

В связи с различными подходами к оценке биоэнергетического потенциала, используемого различными

авторами, корректная оценка доли России в мировом биоэнергетическом потенциале затруднена. При использовании мирового потенциала в диапазоне от 64 до 161 ЭДж доля России, принятая в 3 ЭДж, будет составлять от 1,8 до 4,6%. Это значение составляет примерно половину биоэнергетического потенциала Европейского союза [24].

Литература

1. Александров В. Зерну — дорогу! // Транспорт России. — 2010. — № 43(643). — Интернет: <http://www.transportrussia.ru/infrastructure/zernu-dorogu.html>.
2. Государственный доклад «О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2011 году». Интернет: <http://www.mnr.gov.ru/regulatory/list.php?part=1392>.
3. Ильиных Г.В. Оценка теплотехнических свойств твердых бытовых отходов исходя из их морфологического состава // Вестн. ПНИПУ. Урбанистика, — 2013. — № 3(11). — С. 125–137.
4. Каракчиева И.В. Проблемы ведения лесного хозяйства в России — расчетная лесосека // Современные наукоемкие технологии. — 2010. — № 9 — С. 144–147. Интернет: <http://www.top-technologies.ru/ru/article/view?id=25395>.
5. Карлова Н. Российский зерновой рынок: рекорды 2013/2014 МГ и перспективы нового сезона // Экономическое развитие России. — 2014. — № 9. — С. 34–36.
6. Касьянов А.С. Энергетический потенциал соломы как биотоплива // Инженерный вестник Дона. — 2014. — № 1. Интернет: <http://www.ivdon.ru/ru/magazine/archive/n1y2014/2225>.
7. Климатическая доктрина Российской Федерации от 17 декабря 2009 года. Интернет: <http://kremlin.ru/events/president/news/6365>.

8. Левин А.Б. Биоэнергетика — важнейшее средство повышения энергоэффективности лесного комплекса России // Журнал «Лесной вестник» МГУЛ. — 2012. — № 8(91). — С. 160—165. Интернет: <http://gnclpkte.ru/wp-content/themes/zeecompany/images/Publications/Bioenergy-is-an-important-means-of-improving-the-efficiency-of-the-Russian-timber-industry.pdf>.
9. Методические рекомендации по технологическому проектированию систем удаления и подготовки к использованию навоза и помета. РД — АПК 1.10.15.02.-08 / Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. — М., 2008. — 91 с.
10. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. Агропромышленный комплекс России в 2013 году. — М., 2014. — 669 с. Интернет: <http://www.mcx.ru/navigation/page/show/205.htm>
11. Могилевцев В.И., Брюханов А.Ю., Максимов Д.А., Васильев Э.В., Субботин И.А., Чернин С. Я., Парубец Ю. С., Гарзанов А.Л. Утилизация навоза/помета на животноводческих фермах для обеспечения экологической безопасности территории, наземных и подземных водных объектов в Ленинградской области. Государственное научное учреждение Северо-Западный научно-исследовательский институт механизации и электрификации сельского хозяйства Россельхозакадемии. — СПб, 2012. — С. 237. Интернет: <http://www.eco.szni.ru/booklet.pdf>.
12. Новая расчетная лесосека по России составляет, по данным Рослесхоза, 635 млн кубометров. Портал Wood.Ru. 15.03.2008. Интернет: <http://www.wood.ru/ru/lonewsid-20886.html>.
13. Приказ Минприроды России «Об утверждении комплексной стратегии обращения с твердыми коммунальными (бытовыми) отходами в Российской Федерации» от 14.08.2013 № 298.
14. Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций (ФАО). Глобальная оценка лесных ресурсов 2010 года. Основной отчет. Документ ФАО по лесному хозяйству, № 163. — Рим, Италия, 2010. — 371 с. Интернет: <http://www.fao.org/docrep/014/i1757r/i1757r.pdf>.
15. Соколов В.А., Багинский В.Ф. О методике исчисления расчетных лесосек // Сибирский лесной журнал. — 2014. — № 5. — С. 9—15.
16. Справочник по ресурсам возобновляемых источников энергии России и местным видам топлива: (показатели по территориям) / Рос. инженер. акад., Рос. союз науч. и инженер. оществ. орг., Ин-т энергет. стратегии; под ред. Безруких П.П. — М.: Энергия, 2007. — 272 с.
17. Суханов В.С. Роль биоэнергетики в повышении эффективности лесопромышленного комплекса // Деревообрабатывающая промышленность. — 2010. — № 1. — С. 2—5.
18. Шагайда Н.И., Узун В.Я. Продовольственная безопасность: проблемы оценки // Вопросы экономики. — 2015. — № 5. — С. 63—78. Интернет: http://www.iep.ru/files/text/nauchnie_jurnali/shagaida_vopreco_5-15.pdf.
19. Шахов А.В. Методические основы оценки биоэнергетического потенциала в сельскохозяйственном производстве // «Вести высших учебных заведений Черноземья». — Липецк: ЛГТУ, 2011. — № 1. — С. 3—7. Интернет: http://www.stu.lipetsk.ru/files/materials/4737/2011_01_001.pdf.
20. Appendix B: Biodiesel Standarts / In: The Biodiesel Handbook, Knothe, G., Gerpen, J.V., and Krahl, J. (Eds.). — Illinois: AOCS Press, 2005. — P. 278—285.
21. Bratanova A., Robinson J., Wagner L. New technology adoption for Russian energy generation: What does it cost? A case study for Moscow // Applied Energy. — 2016. — Vol. 162. — P. 924—939.
22. FAOSTAT (2015). Food and Agriculture Organization Statistics. <http://www.fao.org/faostat>, По состоянию на ноябрь 2015.
23. FAO Statistical Yearbook — Land use. 2010. FAOSTAT. Table A4. Интернет: <http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/ess-yearbook2010/yearbook2010-reources/en/>.
24. Long H., Li X., Wang H., Jia J. Biomass resources and their bioenergy potential estimation: A review // Renewable and Sustainable Energy Reviews. — 2013. — Vol. 26. — P. 344—352.
25. Lykova N., Gustafsson J.E. A survey of biofuel production potentials in Russia // Scientific Journal of Riga Technical University. Environmental and Climate Technologies. — 2010. — Vol. 4. — No. 1. — P. 64—75.
26. Moody J.W., McGinty C.M., Quinn J.C. Global evaluation of biofuel potential from microalgae // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2014. — Vol. 111. — No. 23. — P. 8691—8696.
27. Pristupa A.O., Mol A.P.J., Oosterveer P. Stagnating liquid biofuel developments in Russia: Present status and future perspectives // Energy Policy. — 2010. — Vol. 38. — No. 7. — P. 3320—3328.
28. Pristupa A.O., Mol A.P.J. Renewable energy in Russia: The take off in solid bioenergy? // Renewable and Sustainable Energy Reviews. — 2015. — Vol. 50. — P. 315—324.
29. Proskurina S., Rimppi H., Heinimö J., Hansson J., Orlov A., Raghu K.C., Vakkilainen E. Logistical, economic, environmental and regulatory conditions for future wood pellet transportation by sea to Europe: The case of Northwest Russian seaports // Renewable and Sustainable Energy Reviews. — 2016. — Vol. 56. — P. 38—50.
30. Schierhorn F., Müller D., Prishchepov A.V., Faramarzi M., Balmann A. The potential of Russia to increase its wheat production through cropland expansion and intensification // Global Food Security. — 2014. — Vol. 3. — No. 3. — P. 133—141.

EVALUATION OF RAW MATERIAL BASE OF THE RUSSIAN FEDERATION FOR THE PRODUCTION OF FUELS AND ENERGY FROM BIOMASS

Z.B. NAMSARAEV^{1,2}, P.M. GOTOVTSEV¹, A.V. KOMOVA¹,
A.V. BORGLOV¹, Y.E. SERGEEVA¹, R.G. VASILOV¹

¹ *National Research Centre «Kurchatov Institute»*

² *S.N. Vinogradsky Institute of Microbiology, Moscow*

The review carried out a preliminary assessment of Russia's bioenergy potential. It was 3038 PJ (3 EJ) or 103686 thousand tce. (data 2011). The share of plant waste agricultural sector was 41% of the total capacity, the share of animal waste – 20%, the share of waste timber industry – 16%, the share of municipal solid (household) waste – 23%. Considering the assessment of the global bioenergy potential in the range from 64 to 161 EJ, Russia's share in it is from 1.8 to 4.6%.

Keywords: biotechnology, biofuels, biomass, raw material base.

К 80-ЛЕТИЮ ВЫХОДА В СВЕТ СТАТЬИ Н.В. ТИМОФЕЕВА-РЕСОВСКОГО, К. ЦИММЕРА И М. ДЕЛЬБРЮКА – ВАЖНОЙ ВЕХИ В ИСТОРИИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

О.В. ВОРОБЬЕВА*

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

В статье проводится рассмотрение исторического значения знаменитой статьи Н.В. Тимофеева-Ресовского, К. Циммера и М. Дельбрюка «О природе генных мутаций и структуре гена» в связи с 80-летием ее публикации. Эта работа привлекает внимание исследователей по причине того, что она предопределила создание нового направления в биологии — поиска путей к идентификации подлинной молекулярной структуры гена. Наряду с анализом содержания данной классической работы охарактеризованы личный вклад и профессиональные интересы каждого ее соавтора. Приводится ретроспективный комментарий некоторых событий, связанных с обсуждаемой памятной датой.

Ключевые слова: молекулярная биология, генная структура, история.

Уже много раз говорилось о значимости отдельных научных открытий в преемственном коллективном творчестве ученых. В отношении генетики и молекулярной биологии обычно называются имена Менделя, Моргана, Уотсона — Крика и т.д. Но профильные специалисты и историки науки всегда помнят о череде энтузиастов, которые как бы подготавливают профессионалов к очередному прорыву в глубине познания сущности вещей. Это особенно наглядно демонстрируется на примере так называемой «молекулярно-биологической гонки», полные драматизма события которой сопровождали человечество на протяжении XX столетия.

Здесь в центре внимания оказалась «наследственная молекула» как материальный носитель сущности живого организма. Понятие гена, сформулированное в начале XX века, уже подводило к этому, и тогдашний уровень знаний уже мог позволять ставить вопрос о химической структуре такого образования. Естественно, степень сложности заставляла ученых обращать взор на белки. Хотя ретроспективно на этом фоне заставляет удивляться тетра nukлеотидная гипотеза ученика И.П. Павлова Фибуса Левина, эмигрировавшего в США, которая, хотя оказалась неверной, привлекла внимание к выяснению роли нуклеотидов в наследственности.

Но в еще большей мере удивляет и восхищает прозорливость Николая Константиновича Кольцова, с полной убежденностью в своей правоте выдвинувшего идею самоудвоения, или репликации, наследственной молекулы (которую, правда, он считал белком). Это он сделал в 1927 году на Всероссийском съезде зоологов, анатомов и гистологов в Ленинграде и напечатал об этом на русском и немецком языках [3, 10]. Ему не удалось по разным причинам лично довести до признания справедливость данной идеи, но примечательно, что это начали делать его ученики и последователи и, в первую очередь, Н.В. Тимофеев-Ресовский.

Н.В. Тимофеев-Ресовский (1900—1981) — знаковая фигура в отечественной биологии. Он происходил из состоятельной семьи, среднее образование получил в 1-й мужской киевской гимназии, где учились Вертинский, Паустовский и другие будущие российские знаменитости. В Московском университете занялся биологией, став учеником С.С. Четверикова и Н.К. Кольцова. По рекомендации последнего в 1925 году был командирован в Германию, в Институт мозга, руководимый О. Фохтом. Там сблизился с рядом физиков, проявлявших интерес к биологии. В результате вышла их совместная статья, которая вызвала большой интерес среди биологов. Затем было вынужденное проживание в Германии в 1930—1940-е годы, послевоенный арест, осуждение и пребывание в заключении, работа сначала в закрытых, потом — открытых учреждениях по проблемам главным образом радиационной биологии; вообще — сложная судьба. Тем не менее ученому удалось многое сделать и в этой ситуации, и его имя заняло достойное место в научной летописи.

© 2015 г. Воробьева О.В.

* **Автор для переписки:**

Воробьева Ольга Вадимовна

к.м.н., зав. редакцией журнала «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова», Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

E-mail: ptashka095@rambler.ru

Как уже упоминалось, в истории науки встречаются заметные события, которые обозначают собой или явное открытие по типу озарения, или предвестника какого-то предстоящего великого открытия. К последнему типу относится выход в свет 80 лет назад в 1935 году статьи Тимофеева-Ресовского, Циммера, Дельбрюка «О природе генных мутаций и структуре гена» на немецком языке. Ее еще принято называть «Работой трех мужчин» — «Drei Menschen Werk» или «Зеленая тетрадь» — «Grünes Pamphlet» (такой цвет имели оттиски из «Новостей Геттингенского общества естествоиспытателей», в которых была напечатана статья). Ссылка: Timofeev-Ressovsky N.V., Zimmer K.G., Delbrueck M. Ueber die Nature der Genmutation und der Genstruktur // Nachr. Ges. Wiss. Goettingen, Math.-Phys. Klasse, Fachgr. 6, N.F. — 1935. — Bd. 1. — No. 13. — S. 189–245 [14] (рис. 1).

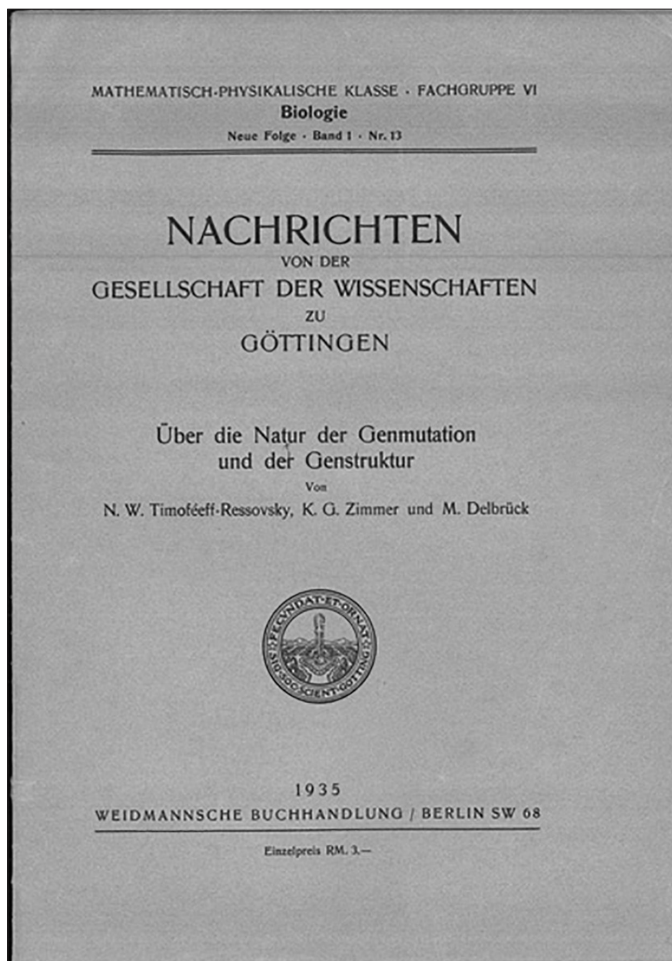


Рис. 1. Титульный лист оттиска статьи Тимофеева-Ресовского, Циммера, Дельбрюка (1935)

Опубликован русский перевод статьи: Тимофеев-Ресовский Н.В., Циммер К.Г., Дельбрюк М. О природе генных мутаций и структуре гена // В кн.: Тимофеев-Ресовский Н.В. Избранные труды. Генетика. Эволюция.

Биосфера / Ред. О.Г. Газенко, В.И. Иванов. — М.: Медицина, 1996. — С. 105–153 [5]. Русский перевод имеется также на сайте: [http://www.jinr.ru/~drrt/Timofeeff/auto/pdf/mut\(i-ii\)_r.pdf](http://www.jinr.ru/~drrt/Timofeeff/auto/pdf/mut(i-ii)_r.pdf).

Об этой статье уже много писалось в исторических исследованиях и за ней прочно закрепилось наименование «классическая». Но в науку приходят новые поколения работников, и от кого-то, сведущего в истории, требуется восстановить связь времен и вновь возвращаться к свершившемуся значительному факту. Самое загадочное в нем было то, что нужно было в нужное время и в нужном месте собраться трем совершенно разным людям. Один из них — Макс Дельбрюк [2, 8], выходец из профессорской берлинской семьи, правнук прославленного химика Либиха, другой — Николай Владимирович Тимофеев-Ресовский, русский биолог, ученик Н.К. Кольцова, командированный в Германию, третий — Карл Циммер, начинающий немецкий физик, в будущем — участник советской ядерной программы. Все — молодые, талантливые люди, полные амбиций, открытые ко всему неизведанному и жаждущие найти или воспринять новое (рис. 2).

Трудно отдать кому-нибудь из них предпочтение, но объективно инициатором являлся Н.В. Тимофеев-Ресовский. Именно вокруг его идеи наследственной молекулы, принесенной из России и сформулированной его учителем Н.К. Кольцовым, сконцентрировали мысли авторы рассматриваемой статьи. В ней освещены принципы мутагенеза — попадания и мишени. Кратко представлены взгляды Н.К. Кольцова на природу гена. В работе были изложены все известные к тому времени базовые факты и объяснения радиационного мутагенеза и предполагаемой структуры гена. В ней же Дельбрюк высказал свои первые соображения о физических основах построения молекулярных структур, имеющих отношение к наследственности.

Структурно статья состоит из четырех частей. В первой части статьи Н.В. Тимофеев-Ресовский описывает мутагенный эффект рентгеновского и гамма-излучения на дрозофил. Во второй части К. Циммер проводит теоретический анализ данных, полученных Тимофеевым-Ресовским. В третьей части Дельбрюк предлагает модель мутагенеза, основанную на атомной физике. В четвертой части все три упомянутых автора проводят совместное обсуждение результатов и предмета в целом, рассматривая вопросы теории мутагенеза и структуры гена.

Авторы выдвинули представление, что мутация представляет собой структурную реорганизацию внутри отдельной молекулы, а ген является соединением атомов, в котором может происходить мутация как молекулярная реорганизация или диссоциация связей.

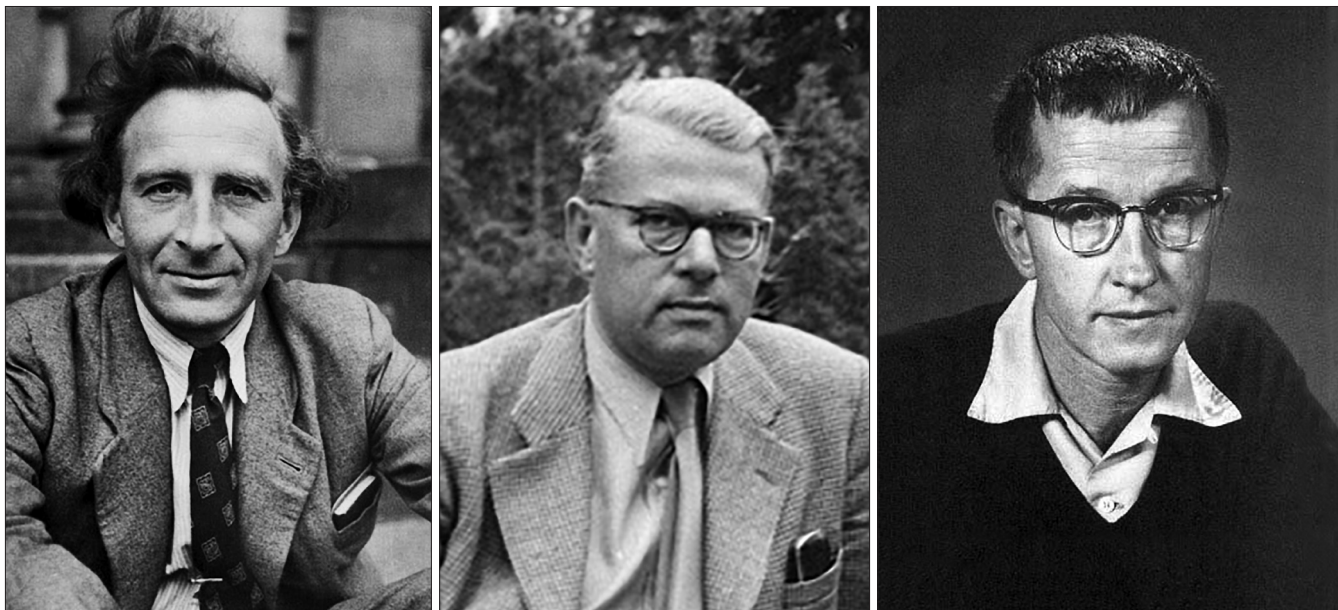


Рис. 2. Тимофеев-Ресовский Н.В., Циммер К., Дельбрюк М. (слева направо) — авторы известной «Работы трех мужчин», или «Зеленой тетради» (1935)

Было бы недостаточно говорить о роли статьи только в привязке к 1935 году и об ее значении лишь для текущего момента. Ее вклад высвечивается в динамике событий — от 1928 до 1953 года, времени расшифровки структуры ДНК. За этот период произошел еще ряд событий. Прежде всего, обращение к содержанию статьи физика Эрвина Шредингера, который в 1944 году, отталкиваясь от ее положений, написал работу «Что такое жизнь с точки зрения физики?» [6, 13, 16]. Он со своим огромным признанием — лауреат Нобелевской премии 1933 г., автор знаменитого уравнения Шредингера — сыграл ключевую роль в идентификации реальной структуры гена. Шредингер со свойственной ему прямоотой не вдавался в подробности авторских вкладов статьи 1935 года, чаще всего упоминая привычное германоязычному уху имя «Дельбрюк» и даже назвав одну из глав своей нащумевшей книги «Модель Дельбрюка». Но ведь суть не в этом, а в том, что абсолютный авторитет в физике тех дней начал горячо отстаивать принцип «осязательности» гена, приближения к пониманию его материальной организации (даже называя ген «апериодическим кристаллом»).

Именно после презентации Шредингером основных фактов указанной статьи 1935 года много физиков пришло в область биологии. Известно, что ее читали Уотсон, Крик, Уилкинс и другие в будущем известные генетики и под впечатлением от прочитанного стали заниматься молекулярной биологией. В этом состоит историческое значение «Работы трех мужчин». Надо указать на то, что процесс осмысления фактов 1930-х

годов был синхронизирован с обнаружением в 1944 г. Эйвери причастности ДНК к передаче наследственных признаков, а феноменальное открытие Уотсона и Крика 1953 года закрепляло стратегическую линию на изучение нуклеопротеидов в контексте генетики и способствовало притоку в эту сферу еще большего числа специалистов, особенно биохимиков и химиков-органиков.

Это подчеркивал и сам Н.В. Тимофеев-Ресовский в своих воспоминаниях [4]: «Уже потом, после конца войны, было ясно показано, что хромосомы, а следовательно, и сидящие в них гены являются нуклеопротеидами. И тогда целая армия биохимиков, среди которых были и настоящие биохимики, но очень много просто органиков-аналитиков, и некоторое количество физиков бросились на анализ и выяснение структуры тех нуклеопротеидных образований, которые образуют основу хромосомы, а, следовательно, и ген. Довольно быстро развивалось дело. Причем главная мыслительная работа была проделана в Англии Криком, а главная, так сказать, химическая работа была проделана в Америке. В Америке ведь скопился к концу 40-х годов и в 50-е годы весь цвет европейской науки: подрапали, кто мог, еще во время войны, многие после войны». Стиль русского ученого характерен и отличается своеобразным колоритом и юмором, но фактура, содержательная часть точна и однозначна. В этой связи не будет излишним исторический комментарий Тимофеева-Ресовского по поводу Макса Дельбрюка, «отца молекулярной биологии» («Vater der Molekularbiologie», как его именовали соотечественники-немцы): «В начале 30-х годов я сдружился и, так

сказать, втянул в наши работы Макса Дельбрюка. Он был чисто теоретический физик, ученик Макса Борна и Нильса Бора. Я его, в сущности, переманил в биологию теоретическую. Он сейчас очень крупный вирусолог и теоретический биолог в Америке, нобелевский лауреат, вообще очень замечательный человек. Тогда он был молодой человек и, как смолоду все крупные теоретики, немножко нагловат, но это ничего. Мы с ним тоже нагло обращались, так что он обтесался очень быстро у нас и стал вполне приемлемым молодым человеком». И еще: «...Меня многие, особенно там, за рубежом, считают чем-то вроде деда этого направления, потому что новая послевоенная редакция его была запущена Дельбрюком, а Дельбрюку соответствующую вещь я заправил в мозги в 30-е годы». Подкрепляет эту мысль и другой соавтор «Работы трех мужчин» — К. Циммер: «...После нескольких месяцев Дельбрюк так заинтересовался количественной биологией и, в частности, генетикой, что он так и остался в этом поле деятельности навсегда» [2].

Однако это только взгляды Тимофеева-Ресовского и его коллег. Между тем для истории существенны разные точки зрения, особенно по вопросу о роли Шредингера. Важны также высказывания других выдающихся ученых о следе, который оставила обсуждаемая статья 1935 года, и о реакции на нее авторитетного австрийского физика. Здесь имеются различные мнения и, конечно, среди них есть и спорные.

Во-первых, важен комментарий Дельбрюка, который немедленно отозвался на появление книги Шредингера своей статьей «Что есть жизнь? Что есть истина», 1945 [7]. Он выразил несогласие с рядом его теоретических положений и изложением сущности фактов, представленных тремя авторами. И в будущем он продолжал вести дискуссии с Шредингером. Однако в целом Дельбрюк считал книгу полезной для физиков, занимающихся биологией. Известна и реакция Германа Меллера [11]. Он более резко критикует автора, отмечая ошибки в генетических терминах, недостаточное рассмотрение химии, а также субъективизм и мистицизм в некоторых обобщениях (особенно в эпилоге книги).

Имеются и суждения химиков по данному вопросу, правда, отсроченные, обнародованные спустя 40 лет в книге, вышедшей к 100-летию со дня рождения Шредингера. В ней Лайнус Полинг (к тому времени уже дважды лауреат Нобелевской премии) говорит, что он был разочарован чтением труда австрийского физика, а другой лауреат Нобелевской премии по химии 1962 года Макс Перутц критикует Шредингера за игнорирование химического аспекта обсуждаемого предмета. Кроме

того, он в статье «Физика и тайна жизни» подчеркивает, что Шредингер по сути пересказывает две основные главы «Работы трех мужчин». Поэтому Перутц заявляет, что ретроспективно главная заслуга книги состоит в «популяризации статьи Тимофеева, Циммера и Дельбрюка, которая иначе осталась бы неизвестной вне круга генетиков и радиобиологов» [12]. Скорее всего, такая оценка суживает значение сделанного Шредингером. В истории науки имеется прецедент: открытие Грегора Менделя. О нем он сообщил в публикации 1866 года и ее оттиски разослал по европейским университетам и лабораториям. Это же сделали и «трое мужчин» в 1935 году, разослав 200 своих «зеленых тетрадей» в профильные учреждения. Первая статья ждала своего повторного открытия 50 лет, а вторая — 10 лет. В обоих случаях сыграли роль выдающиеся личности, представлявшие и оценивавшие их. Менделевские факты пропагандировал У. Бэтсон [1] в Великобритании, на родине Дарвина с его сверхавторитетом и господством эволюционной теории. Бэтсон много сделал, чтобы утвердить новое направление в биологии и предложил термин «генетика». Таков был итог великого открытия в биологии XIX века. Что касается самого крупного биологического открытия XX века — определения структуры ДНК, — то оно было подготовлено в течение столетия: от созревания и формулирования идеи репликации наследственной молекулы Н.К. Кольцовым до расшифровки строения ДНК Уотсоном и Криком. За эти 50 лет решающим событием стал выход статьи 1935 года, которая в течение 10 лет (из них 5 лет войны) не привлекала внимание исследователей, хранясь на полках библиотек, но благодаря гению Шредингера, его своевременному анализу и расстановке приоритетов придала скорость и концентрацию усилий поискам ученых и привела к открытию структуры ДНК. Так что нельзя согласиться с мнением Перутца о «пересказе» или «популяризации» данных статьи 1935 года. Здесь все гораздо глубже.

И еще небольшая ремарка. Не наша вина, а наша беда, что выдающаяся заслуга русского ума — первое в мире выдвижение Н.К. Кольцовым идеи структурирования и самовоспроизведения наследственных молекул — не была официально записана во всемирный исторический контекст последовательного и преемственного накопления биологических фактов. Сам генератор идеи умер от сердечного приступа в 1940 году после целенаправленной кампании критики, а прямой ученик, последователь и носитель информации из первых рук — Н.В. Тимофеев-Ресовский — был подвергнут заключению, ограничению деятельности или изоляции от научного информационного

пространства в течение долгих лет (1940—1960-е годы). Кроме того, в СССР в 1930—1960-х годах на государственном уровне официально осуждалась генетика. В мире в это время происходил бурный прогресс молекулярной биологии и пора исторического осмысливания данного процесса не была актуальной. Поэтому несколько поколений ученых оказались в состоянии неинформированности. Правда, отдельные промежуточные этапы указанного процесса периодически анализировались и обобщались. Безусловно, статья трех авторов 1935 года всегда почтительно упоминалась, равно как и презентация их данных Шредингером. Но редко кто вспоминал о приоритете и пророческих взглядах Н.К. Кольцова, несмотря на то, что в текстах на немецком языке Н.В. Тимофеев-Ресовский упоминал о своем учителе. Да и мало кто помнил о кольцовском тезисе «*Omnis molecula e moleculae*». Среди иностранцев, пожалуй, только Дж. Холдейн, человек глубоких знаний, знакомый с литературой и трудами лидеров биологии того времени, при рассмотрении содержания книги Шредингера, делает замечание в связи с неупоминанием приоритета Н.К. Кольцова в отношении репликации генетического материала [9].

Таким образом, видно, что рассматриваемая статья является одним из ключевых звеньев в цепи основополагающих событий, которые формировали нарождающуюся молекулярную биологию в мире. Причем, становится ясным, насколько существенным был русский вклад в это дело. Жаль только, что последующий разгром генетики в нашей стране на многие годы стер историческую память, особенно за рубежом (за очень редкими исключениями в головах отдельных лояльных к России лиц и вообще уникальных ученых-энциклопедистов — Г. Меллер, Дж. Холдейн и др.). Поэтому нашим специалистам приходится *post factum* по крупицам проводить исторические реконструкции, дабы не допускать фигур умолчания по незнанию или преднамеренной фальсификации.

И заключая статью, надо упомянуть о судьбе самих авторов проанализированной статьи. Макс Дельбрюк впоследствии выполнил основополагающие работы по молекулярной биологии вместе с Сальвадором Лурия и Алфредом Херши, стал Нобелевским лауреатом в 1969 году. Посмертно удостоен высокой чести присвоения его имени Центру молекулярной медицины в Берлин-Бухе (Германия). Н.В. Тимофеев-Ресовский, несмотря на трудную судьбу, получил признание на родине и в мире. Важна его роль в возобновлении генетических исследований в нашей стране в 1950—1960-е годы и подготовке соответствующих кадров. Чтут его и в Германии, где он

трудился 20 лет: там ему установили мемориальную доску на здании в Берлин-Бухе, в котором он жил и работал в 1931—1945 гг. (рис. 3).



Рис. 3. Мемориальная доска Н.В. Тимофееву-Ресовскому на здании института в Центре молекулярной медицины имени Макса Дельбрюка (Берлин-Бух)

Наконец, третий автор — Карл Циммер — уже в 1930-е годы стал авторитетным биофизиком-радиобиологом Германии. После Второй мировой войны он был привлечен к советскому ядерному проекту в группу Рюля (до 1955 года). По возвращении на родину возглавил радиобиологическую лабораторию в Национальном исследовательском центре в Карлсруэ [15].

Литература

1. Воробьев В.С. К 100-летию выхода в свет книги У. Бэтсона «Проблемы генетики» // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2013. — Т. 9. — № 3. — С. 81—91.
2. Воробьев В.С. Макс Дельбрюк — путь от физики к биологии: К 100-летию со дня рождения и 25-летию со дня смерти // Вестник физико-химической биологии и биотехнологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2006. — Т. 2. — № 3. — С. 68—77.
3. Кольцов Н.К. Физико-химические основы морфологии хромосом: Автореф. доклада на III Всесоюзном съезде зоологов, гистологов и эмбриологов. — Л., 1928. — С. 39—41.
4. Тимофеев-Ресовский Н.В. Воспоминания: Истории, рассказанные им самим, с письмами, фотографиями и документами / Сост. и ред. Дубровина Н. — М.: Согласие, 2000. — 880 с.
5. Тимофеев-Ресовский Н.В., Циммер К.Г., Дельбрюк М. О природе генных мутаций и структуре гена // В кн.: Тимофеев-Ресовский Н.В. Избранные труды. Генетика. Эволюция. Биосфера / Ред. О.Г. Газенко, В.И. Иванов. — М.: Медицина, 1996. — С. 105—153. Русский перевод имеется также на сайте: [http://www.jinr.ru/~drrr/Timofeeff/auto/pdf/mut\(i-ii\)_r.pdf](http://www.jinr.ru/~drrr/Timofeeff/auto/pdf/mut(i-ii)_r.pdf).

6. Шредингер Э. Что такое жизнь с точки зрения физики? – М.: Государственное издательство иностранной литературы, 1947. – 150 с.
7. Delbrueck Max. What is Life? What is Truth? // Quarterly Review of Biology. – 1945. – Vol. 20. – P. 370–372.
8. Fisher E.P. and Lipson C. Thinking about science: Max Delbrueck and the the origins of molecular biology. – New York: W.W. Norton, 1988. – 334 p.
9. Haldane J.B.S. A physicist looks at genetics // Nature. – 1946. – Vol. 156. – P. 375–376.
10. Koltzoff N.K. Physikalisch-chemische Grundlage der Morphologie // Biol. Zbl. – 1928. – Bd. 48. – H. 6. – S. 345–369.
11. Muller H.J. A physicist stands amazed at genetics // J. Hered. – 1946. – Vol. 37. – P. 90–92.
12. Perutz M. Physics and the riddle of life // Nature. – 1987. – Vol. 326. – P. 555–559.
13. Schrödinger E. What is life? – Cambridge University Press, 1944. – 194 p.
14. Timofeev-Ressovsky N.V., Zimmer K.G., Delbrueck M. Ueber die Nature der Genmutation und der Genstruktur // Nachr. Ges. Wiss. Goettingen, Math.-Phys. Klasse, Fachgr. 6, N.F. – 1935. – Bd. 1. – No. 13. – S. 189–245.
15. Wunderlich V. In Commemoration of the 100th Birthday of Karl Günther Zimmer: «That was the basic radiobiology that was». – Max Delbrück Centrum for Molecular Medicine, D-13125 Berlin-Buch, 2011.
16. Yoxen E.J. Where does Schroedinger's «What is life» belong in the history of molecular biology? // Hist. Sci. – 1979. – Vol. 17(35 Pt 1). – P. 17–52.

ON THE 80TH ANNIVERSARY OF THE PUBLICATION OF THE ARTICLE N.V. TIMOFEEV-RESSOVSKY, K. ZIMMER AND M. DELBRÜCK – A MILESTONE IN THE HISTORY OF MOLECULAR BIOLOGY

O.V. VOROBYEVA

Yu.A. Ovchinnikov Russian Biotechnology Society, Moscow

In the article the review of the historical significance of the famous article of N.V. Timofeev-Ressovsky, K. Zimmer and M. Delbrück «On the nature of gene mutation and gene structure» in connection with the 80th anniversary of its publication was presented. This work has attracted the attention of researchers due to the fact that it led to the creation of a new direction in biology – finding ways to identify the true molecular structure of the gene. Along with the analysis of the contents of this classic work the personal contribution and professional interests of each of its co-author were characterized. We present a retrospective comment some of the events associated with the mentioned memorable date.

Keywords: molecular biology, gene structure, history.

К 80-ЛЕТИЮ ОТКРЫТИЯ А.Н. БЕЛОЗЕРСКИМ ДНК В РАСТЕНИЯХ

В.С. ВОРОБЬЕВ*

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

В работе рассматривается значение открытия А.Н. Белозерским ДНК в растениях в связи с 80-летием выхода в свет статьи на эту тему. Анализируется исторический контекст данного события, подчеркивается роль научной школы и преемственности в исследованиях.

Ключевые слова: ДНК, растения, молекулярная биология, история, А.Н. Белозерский.

В 2015 году исполнилось 80 лет со времени выхода в свет статьи Андрея Николаевича Белозерского о наличии ДНК в растениях. Дата не круглая, но значимая. Так что имеется повод вспомнить об ученом, тем более есть и другая связанная с ним дата — 110 лет со дня рождения. Для своего времени выход указанной статьи не был каким-то экстраординарным событием, поскольку тематика нуклеиновых кислот еще не набрала силу и сама проблема молекулярных основ наследственности еще не относилась к числу приоритетов. Хотя сама по себе эта работа подводила определенный итог в создании общебиологической базы под представления о роли нуклеиновых кислот.

А.Н. Белозерскому было 30 лет, он уже 5 лет трудился на кафедре биохимии растений под руководством профессора Александра Робертовича Кизеля. Это был ученик К.А. Тимирязева, прошедший блестящую подготовку по биохимии в лучших европейских университетах. Обстановка на кафедре была творческая, доброжелательная, что во многом объяснялось личными качествами профессора. Он был точен, аккуратен, педантичен, как и любой немец, но, как и многие представители данной нации, особенно в прошлом, любил учить, и поэтому всякое пытлиное сердце находило в нем отклик. В лице молодого Белозерского он нашел такого ученика и в связи с этим всячески способствовал его росту. Сам же Белозерский любил и всегда восхищался своим учителем. В послевоенное время из-за репрессий имя Кизеля было подвергнуто забвению, однако после реабилитации исто-

рическая справедливость постепенно восстанавливалась, благодаря чему Андрей Николаевич смог донести следующим поколениям устные предания о своем учителе.

В мемориальной статье, по-видимому, следует отойти от традиционного изложения фактов из жизни и научного вклада того или иного известного ученого в виде последовательной серии как бы заранее запланированных достижений (так часто все преподносится в справочниках и энциклопедиях), а попытаться воссоздать реальную историческую обстановку, в которой происходило накопление достоверных фактов, постепенно закладывавших фундамент будущих основополагающих научных знаний.

В рассматриваемом контексте будет уместно подробнее обсудить тему «учитель-ученик» в непосредственно профессиональном аспекте. Начало совместной работы Кизеля и Белозерского относится к 1929–1930 годам [1]. Сохранились фотографии того периода (рис. 1).

Кизель заметил и познакомился с Белозерским в Ташкенте. Когда в МГУ открыли кафедру физиологии растений, он пригласил к себе ассистентом молодого выпускника Среднеазиатского университета. Начались обычные рабочие будни биохимиков: мытье посуды, изготовление фильтров, сбор материала и т.д. Опытный Кизель увидел задатки исследователя в начинающем работнике и, помимо общего благожелательного отношения к работе, приобщил его к актуальной тематике — изучению нуклеиновых кислот у растений — и таким образом обеспечил преемственность изучения предмета, столь необходимую в подлинном научном творчестве. К 1920-м годам проблема нуклеиновых кислот заняла определенную нишу в биологии. Сформировалось соответствующее направление и в физиологии растений. Однако здесь господствовало представление о разделении «животной» нуклеиновой кислоты (тимонуклеиновой) и «растительной», выделяемой

© 2015 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

из дрожжей. К этому времени была высказана тетра-нуклеотидная гипотеза Фибуса Левина, эмигрировавшего в США ученика И.П. Павлова, которая сначала пользовалась популярностью, а затем была оставлена (особенно после работ Чаргаффа о парных соотношениях азотистых оснований: $A=T$ и $G=C$; $A+G=T+C$).



Рис. 1. Профессор А.Р. Кизель среди сотрудников и студентов (1929–1930 гг.). Стоит крайний справа — А.Н. Белозерский [1]

Известно, что Кизель еще в 1927 году опубликовал статью по проблеме наличия тимина у плазмодиев (слизевиков) — *Fuligo varians* [16]. В 1930-е годы эта тема была продолжена вместе с Белозерским. Результат не замедлил сказаться: в 1934 году в авторитетном Гопше-Зейлеровском журнале физиологической химии (в редколлегию которого входил И.П. Павлов) появилась их совместная статья на немецком языке «Исследования протоплазмы. V. О нуклеиновых кислотах и нуклеопротеидах семян гороха» [15] (рис. 2).

В ней сообщалось о наличии в ростках семян гороха тимонуклеиновой кислоты (так называли тогда ДНК, учитывая, что биохимики в то время выделяли ее из тимуса животных, в противоположность другой нуклеиновой кислоте — дрожжевого типа, нынешней РНК). Кроме того, авторы выделили из ростков семян гороха тимин — пиримидиновое основание, свойственное ДНК.

На следующий год — 1935 г. — Белозерский напечатал статью уже один в журнале «Ученые записки

Московского государственного университета» [7]. В ней сообщалось о дальнейшем прогрессе в изучении нуклеиновых кислот у растений: приводились доказательства нахождения тимонуклеиновой кислоты в растительных клетках, а именно: был выделен и идентифицирован тимин. Лучше всего с ними знакомиться в авторском исполнении — выводы данной статьи приводятся на факсимиле оригинального текста (рис. 3 а, б).

Особенно демонстративны и значимы для последующих исследований нуклеопротеидов выводы 2 и 3:

«2. При гидролизе нуклеотидов из нуклеиновых оснований, кроме гуанина, аденина и цитозина, найден также и идентифицирован тимин.

3. На основании продуктов гидролиза и качественной реакции Фейльгена мы заключаем о наличии в нуклеопротеидах ростков семян гороха нуклеиновой кислоты типа тимонуклеиновой кислоты.»

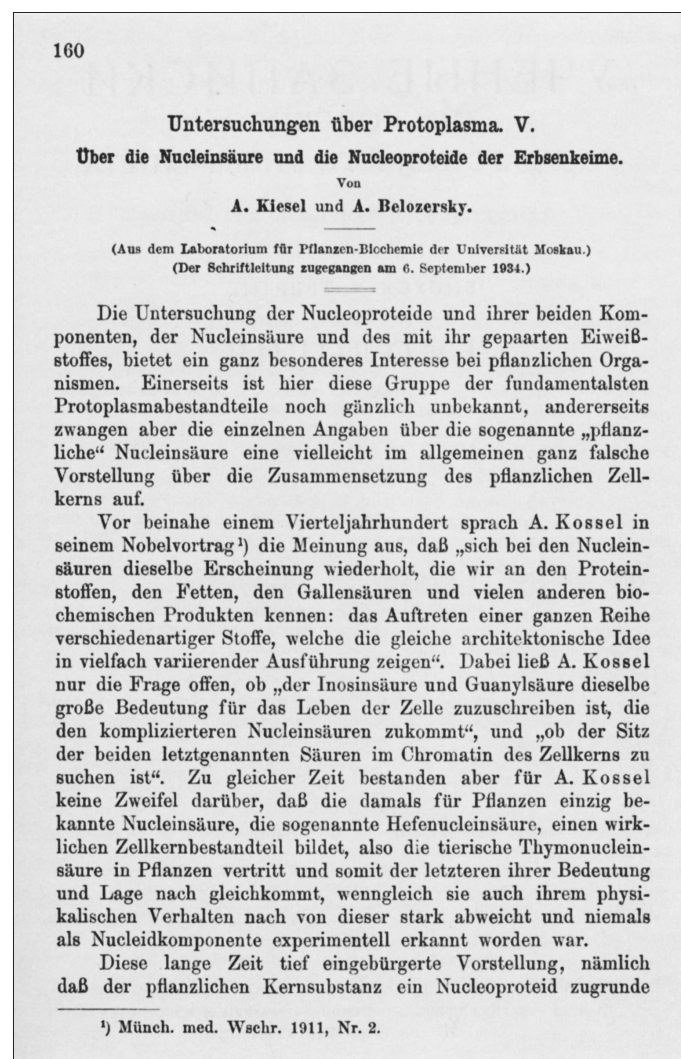


Рис. 2. Первая страница статьи А.Р. Кизеля и А.Н. Белозерского на немецком языке о нуклеиновых кислотах и нуклеопротеидах семян гороха (1934) [15]

О НУКЛЕИНОВОМ КОМПЛЕКСЕ РОСТКОВ СЕМЯН ГОРОХА

А. Белозерский

[Сборник трудов Научно-исследовательского института ботаники, № 1]

СЕКЦИЯ БИОХИМИИ

Долгое время считалось общепринятым, что растения содержат особую растительную нуклеиновую кислоту, отличную от животной или тимонуклеиновой кислоты. Классическим примером растительной нуклеиновой кислоты служила нуклеиновая кислота, выделенная впервые в чистом виде в конце прошлого столетия Альтманом, из дрожжей. В 1902 г. Осборн и Гаррис¹ получили нуклеиновую кислоту из зародышей пшеницы, которую они назвали тритиконуклеиновой кислотой, и указывали на сходство последней с ранее известной дрожжевой нуклеиновой кислотой. Многолетние и обстоятельные исследования Левина² над этими растительными нуклеиновыми кислотами установили их вероятное тождество между собой и отличие от тимонуклеиновой кислоты по ряду свойств и на основании продуктов гидролиза.

Взгляд на существование в растениях особой нуклеиновой кислоты был поколеблен после работ Джонсона и Брауна³ над туберкулиновой кислотой, которую они получили из туберкулезных бацилл и обнаружили среди продуктов гидролиза ее, характерное для тимонуклеиновой кислоты пиримидиновое основание — тимин. Однако туберкулиновая кислота вследствие легкой отщепляемости нуклеотида, содержащего гуанин, не тождественна с тимонуклеиновой кислотой, а является тринуклеотидом. Кроме того, несколько позже Джонсон и Когилл⁴ обнаружили среди продуктов гидролиза туберкулиновой кислоты в цитозиновой фракции наряду с цитозином в очень малых количествах новое пиримидиновое основание 5-метилцитозин.

За последние десять лет, после того как Фейльгеном и Росенбеком⁵ в 1924 г. была описана качественная реакция окрашивания с фуксинсернистой кислотой на тимонуклеиновую кислоту, входящую в состав клеточных ядер, рядом авторов⁶ было показано необычайно широкое распространение тимонуклеиновой кислоты в клеточных ядрах самых разнообразных систематических групп растительного мира. Несмотря на надежность реакции Фейльгена, до сих пор не имеется убедительных, подкрепленных химическим анализом, прямых или косвенных указаний на присутствие тимонуклеиновой кислоты в растениях.

С этой точки зрения представляют несомненный интерес работы, касающиеся обнаружения тимина у тех или иных растений, так как последний может косвенно указывать на присутствие в этом растении нуклеиновой кислоты типа тимонуклеиновой кислоты и тем самым в известной степени подкреплять достоверность фейльгеновской реакции. Конечно, наиболее верным доказательством являлось бы выделение этой кислоты как таковой, но

14 Ученые записки МГУ, вып. IV. 7086

Рис. 3а. Первая страница статьи А.Н. Белозерского (1935) [7]

отнесенным к типу гистонов или протаминов. Если сопоставить содержание основных аминокислот в исследованных нуклеопротеидах с содержанием таковых у запасных белков гороха ¹⁵, то можно видеть, что белковый

	Легумин в %	Вицилин в %	Легумелин в %
Аргинин	11,71	8,91	5,45
Гистидин	1,69	2,17	2,27
Лизин	4,98	5,40	3,03
Дикарбоновые кислоты, сумма	22,27	26,64	17,07
Тирозин	1,55	2,38	1,55
Пролин	3,22	4,06	3,96

компонент этих нуклеопротеидов того же типа, что и запасные белки по содержанию оснований и некоторых других аминокислот. Обращает внимание низкое содержание пролина в обоих нуклеопротеидах. Различие в тирозине можно легко наблюдать и непосредственно на препаратах белка: если водорастворимый нуклеопротеид дает с миллиновым реактивом густое мяскокрасное окрашивание, то щелочерастворимый нуклеопротеид—только розовую окраску. Водорастворимый нуклеопротеид более богат аргинином, чем щелочерастворимый нуклеопротеид, но дикарбоновых кислот содержит значительно меньше.

Полученные два нуклеопротеида отличаются друг от друга по белковому компоненту, так как при сравнительно близком содержании фосфора явно выступает резкое различие в содержании отдельных аминокислот.

ВЫВОДЫ

1. Из ростков семян гороха выделены два нуклеопротеида. Водорастворимый нуклеопротеид, состоящий из 16,5% нуклеиновой кислоты и 83,5% белка, и щелочерастворимый нуклеопротеид, состоящий из 18,0% нуклеиновой кислоты и 82,0% белка.

2. При гидролизе нуклеопротеидов из нуклеиновых оснований, кроме гуанина, аденина и цитозина, найден также и идентифицирован тимин.

3. На основании продуктов гидролиза и качественной реакции Фейльгена мы заключаем о наличии в нуклеопротеидах ростков семян гороха нуклеиновой кислоты типа тимонуклеиновой кислоты.

4. Белковые компоненты, входящие наряду с нуклеиновой кислотой в состав нуклеинового комплекса ростков семян гороха, не выдаются своими основными группировками среди других известных нам растительных белков.

В заключение считаю своим приятным долгом выразить глубокую благодарность проф. А. Р. Кизелю за то внимание и интерес, которые им были проявлены при выполнении настоящей работы.

[Ученые записки МГУ, вып. IV, 1935]

В развитие этого направления дальше была проделана целая серия работ ученого, которая создавала ему оригинальное имя в науке [2–6, 8, 9] и впоследствии сформировала школу А.Н. Белозерского. Здесь сначала были проведены выделение и идентификация тимина в нуклеопротеидах, извлеченных из семян бобовых — фасоли и сои. Далее последовала очень важная работа совместно с И.И. Дубровской (1936): впервые в мире из проростков семян конского каштана тимонуклеиновая кислота была выделена как вещество из растительного объекта [2].

В последующие предвоенные и военные годы (1937–1942) А.Н. Белозерским было осуществлено систематическое исследование наличия ДНК наряду с РНК у растений: почки липы, луковицы лука, зародыши пшеницы и кедрового ореха. Итогом этого 10-летнего цикла работ было обоснование отказа от разделения нуклеиновых кислот на «животную» и «растительную». Это был значимый вклад в науку мирового уровня, признанный всеми специалистами.

Нельзя сказать, что все перечисленные добытые знания сразу вошли в обиход научного сообщества. Нуклеиновые кислоты не были в центре внимания биохимиков — приоритет больше находился у белков. Классическая «дрозофильная» генетика не снисходила до открытий в нарождающейся молекулярной биологии. До 1944 года — рубежного открытия Эйвери наследственной роли ДНК — время еще не дошло. Отдельные всплески человеческой мысли, как, например, появление знаменитой «Работы трех мужчин» — статьи Н.В. Тимофеева-Ресовского, К. Циммера, М. Дельбрюка (1935) о структуре гена, оставались незамеченными широкой аудиторией. Понадобился гений Шредингера, всколыхнувшего биологов и физиков своей книгой «Что такое жизнь с точки зрения физики» (1944), чтобы в послевоенное время научный мир обратился к молекулярному уровню, где постепенно выкристаллизовалось представление о решающей роли ДНК.

В этом ракурсе направление работ А.Н. Белозерского вписывалось в общемировые тенденции и преимущественно решало как собственные задачи, так и реагировало на новейшие зарубежные достижения. Так, например, А.Н. Белозерский вместе с А.С. Спириным и другими коллегами в 1957–1958 гг. внесли существенные уточнения в механизмы считывания информации в цепи ДНК-РНК и обосновали идею некодирующих РНК. Это помогло лидерам работ по расшифровке генетического кода во главе с Ф. Криком своевременно скорректировать свои концептуальные установки.

В целом ход исследований А.Н. Белозерского по нуклеиновым кислотам, сохраняя свою оригинальность, смог уцелеть в 1940–1950-е годы в условиях наступившего прессинга лысенковщины [10–14]. Этому в немалой степени способствовало полное отсутствие химической культуры у новоявленных ламаркистов, которые с презрением относились к лабораторным работам и «терпели» изыскания странных субъектов, фанатически изучавших какие-то непонятные кислоты в растениях или микробах. По-видимому, свою роль сыграло и сознательное неупотребление в то время многими отечественными биохимиками термина «ген». Подобная тактика помогла сохранить кадры, материальную базу и возможность трудиться в академических структурах, не подвергаясь риску быть вовлеченными в схоластические споры, а то и вовсе потерять работу. Все это стало возможным, конечно, и благодаря огромному авторитету, такту, интеллигентности Андрея Николаевича. Да и сама фамилия этого удивительного человека звучала так же мелодично и торжественно, как, к примеру, фамилии русских священников: Благовещенский, Вознесенский, Богоявленский и т.д. — в этом ряду Белозерский воспринимался столь же почтенно. Так что и форма, и содержание работали вместе на одну идею: сохранение и приумножение славы российских химиков и биологов.

Но работает не только эмоциональный аспект памяти об ученом. Его дела увековечены созданием Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ (1965). Это одна из ключевых химических точек на стыке с биологией в нашей стране, хранящих отечественные традиции.

Литература

1. Андрей Николаевич Белозерский: к 100-летию со дня рождения: научная и педагогическая деятельность, воспоминания, материалы / [отв. ред. А.С. Спирин]; Ин-т биохимии им. А.Н. Баха РАН. — М.: Наука, 2006. — 369 с.
2. Белозерский А.Н., Дубровская И.И. О белках и тимонуклеиновой кислоте семени конского каштана // Биохимия. — 1936. — Т. 1. — С. 665–675.
3. Белозерский А.Н., Успенская М.С. О нуклеиновом комплексе зародышей и белках эндосперма семян кедрового ореха // Биохимия. — 1942. — Т. 7. — С. 155–162.
4. Белозерский А.Н., Чебуркина Н.В. О нуклеиновом комплексе почек липы // Биохимия. — 1937. — Т. 2. — С. 752–757.
5. Белозерский А.Н., Черномордикова Л.А. О нуклеопротеидах и нуклеиновых кислотах зародышей пшеницы // Биохимия. — 1940. — Т. 5. — С. 133–139.

6. Белозерский А.Н., Чигирев С.Д. О нуклеиновом комплексе ростков семян фасоли // Биохимия. — 1936. — Т. 1. — С. 136–146.
7. Белозерский А.Н. О нуклеиновом комплексе ростков семян гороха // Ученые записки МГУ. — 1935. — Вып. 4. Биология. — С. 209–215.
8. Белозерский А.Н. О нуклеиновых кислотах лука // Докл. АН СССР. — 1939. — Т. 25. — С. 749–750.
9. Белозерский А.Н. О нуклеопротеидах и нуклеиновых кислотах ростков семян сои // Биохимия. — 1936. — Т. 1. — С. 255–268.
10. Воробьев В.С. Из истории отечественной молекулярной биологии: к 100-летию со дня рождения А.Н. Белозерского // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2006. — Т. 2. — № 1. — С. 69–73.
11. К 100-летию со дня рождения академика А.Н. Белозерского // Успехи биологической химии. — 2005. — Т. 45. — С. 455–462.
12. Спиринов А.С., Шамин А.Н. А.Н. Белозерский и развитие молекулярной биологии в нашей стране // Природа. — 1976. — № 10. — С. 72–82.
13. Спиринов А.С. Академик Андрей Николаевич Белозерский и становление молекулярной биологии (к 100-летию со дня рождения) // Вестник РАН. — 2005. — Т. 75. — № 8. — С. 742–750.
14. Спиринов А.С. Краткий очерк научно-исследовательской, педагогической и организационной деятельности / Андрей Николаевич Белозерский. Библиография ученых СССР. — М.: Наука, 1968. — С. 7–19.
15. Kiesel A., Belosersky A. Untersuchungen über Protoplasma. V. Über die Nucleinsäure und die Nucleoproteide der Erbsenkeime // Hoppe-Seyler's Zeitschrift f. physiol. Chem. — 1934. — Bd. 229. — H. 4–6. — S. 160–166.
16. Kiesel A. Untersuchungen über Protoplasma. III. Über die Eiweißstoffe des Plasmodiums von *Fuligo varians* // Hoppe-Seyler's Zeitschrift f. physiol. Chem. — 1927. — Bd. 167. — H. 1–3. — S. 141–162.

ON THE 80TH ANNIVERSARY OF THE DISCOVERY OF DNA IN PLANTS MADE BY A.N. BELOZERSKY

V.S. VOROBYEV

Yu.A. Ovchinnikov Russian Biotechnology Society, Moscow

In this paper the importance of the discovery of DNA in plants by A.N. Belozersky was considered on occasion of the 80th anniversary of the publication of his article on the subject. The historical context of this event was analyzed, also the role of the scientific school and continuity in research was accentuated.

Keywords: DNA, plants, molecular biology, history, A.N. Belozersky.

СОБЫТИЯ

Возвращение Нобелевской медали Джеймсу Уотсону

17 июня 2015 года в Москве, в Президиуме Российской академии наук состоялась церемония возвращения лауреату Нобелевской премии Джеймсу Уотсону его собственной Нобелевской медали, которую ученый впервые за всю историю вручения таких премий был вынужден продать с целью получения средств для продолжения научной работы. Церемония была приурочена к открытой лекции Уотсона «От структуры ДНК к лечению онкологических болезней», с которой он выступил в Президиуме РАН в тот же день.

Предыстория этого события такова. В декабре 2014 года на аукционе Christie's российский бизнесмен Алишер Усманов приобрел Нобелевскую медаль Уотсона за \$4,8 млн. Мотив своего поступка он объяснил так: «Неприемлема ситуация, когда выдающийся ученый вынужден продавать медаль, полученную в знак признания его достижений. Джеймс Уотсон — один из величайших биологов в истории человечества, и его награда за открытие структуры ДНК должна принадлежать ему». Известен и другой его комментарий: «Я считаю недопустимой ситуацию, при которой выдающийся ученый продает награду, полученную за свои достижения. Работы господина Уотсона способствовали исследованиям по борьбе с раком, от которого умер мой отец. Для меня важно, что мои средства будут направлены на научные исследования, а награда останется у человека, который заслужил ее, как никто другой».

Сам же лауреат объяснял причины своего беспрецедентного поступка по продаже высокой награды острой потребностью в деньгах для финансирования научных исследований. 87-летний ученый по-прежнему активен и нуждается в средствах, которые он не может получить в связи с утратой государственной поддержки, особенно после его известных высказываний об этнических особенностях интеллекта. Вырученные деньги он предоставил лабораториям своей alma mater — Индианского университета, Университета Чикаго, Clare College Кембриджского университета в Великобритании, где было сделано его великое открытие (расшифровка структуры ДНК), и лабораторию Колд Спринг Харбор в Нью-Йорке, в которой он трудился долгие годы.

Усманов не присутствовал на церемонии и попросил президента РАН В.Е. Фортова осуществить передачу

медали. Это было сделано им в торжественной обстановке (рис. 1).



Рис. 1. Президент РАН В.Е. Фортов возвращает Нобелевскую медаль ее обладателю — Джеймсу Уотсону

Уотсон сказал по этому случаю: «Я очень рад быть здесь сегодня, благодарю за теплый прием. Я благодарен господину Усманову за то, что он выкупил медаль и вернул ее мне. Я очень люблю приезжать в Россию. Вся свою жизнь я наслаждался русской музыкой и литературой. Россия — страна образованных людей, ее науку необходимо развивать. Главное, что должно двигать человеком — это тяга к новым знаниям, к науке». Аналогичные слова были им сказаны и в интервью для СМИ.

В своем научном докладе ученый остановился на той же теме, которую он рассматривал 7 лет назад, летом 2008 года в сообщении в московском Доме ученых по случаю своего 80-летия, — причине возникновения рака. Как и тогда, аудитория состояла из многочисленных специалистов и почитателей его таланта, что, конечно, ценит выдающийся исследователь, особенно в сравнении с падением своей популярности на родине.

Безусловно, это было волнующее событие и в содержательном, и в этическом, и чисто человеческом плане. В нем есть что-то от Достоевского, Чехова и вообще от корпоративных традиций мирового научного сообщества, идущих из глубины веков. Хорошо, что Россия хранит эти бесценные частицы человеческого разума.

Хотя, может быть, это и неуместно, приведем в связи с изложенным событием информацию о коллеге и дольщике Уотсона по Нобелевской премии — Ф. Крике. В апреле 2013 г. внучка покойного ученого (он умер в 2004 году) продала на аукционе за 2,27 млн. долларов его Нобелевскую медаль. Приобрел реликвию китайский бизнесмен г-н Ванг, руководитель компании Biomobie,

который надеется этой акцией стимулировать дела своей фирмы. Правда, несколько слабым утешением для общества ученых является заверение внучки о том, что 20% от суммы пойдет на спонсирование Института Фрэнсиса Крика.

ПАМЯТНЫЕ ДАТЫ

К 40-летию проведения конференции в Асиломаре

В 1975 году в городе Асиломаре (США) состоялась конференция, посвященная обсуждению проблем, связанных с экспериментами по созданию рекомбинантных ДНК. Инициаторами ее проведения стали выдающиеся молекулярные биологи: Пол Берг, Дэвид Балтимор, Джеймс Уотсон и др. Это было реакцией на возникшие в профессиональной среде опасения в связи с возможными отрицательными последствиями вмешательства ученых в генетическое конструирование.

В конференции приняли участие около 140 специалистов, главным образом, биологов, а также врачей и юристов, поставивших перед собой задачу выработки руководства по безопасному применению технологии рекомбинантной ДНК. При этом обосновывалась необходимость расширения степени общественного обсуждения возникающих проблем.

В результате были выработаны регламенты экспериментальных исследований с вирусами животных,

эукариотами и другими биообъектами с использованием технологии рекомбинантной ДНК.

Ретроспективная оценка значимости Асиломарской конференции свидетельствует о своевременности и правильности принятых на ней решений.

К 40-летию создания моноклональных антител

Метод получения лимфоидных гибридом был разработан в 1975 году Цезарем Мильштейном и Георгом Келлером, которые в 1984 году были удостоены за это Нобелевской премии. Учеными разработаны подходы, дающие возможность широкомасштабного производства моноклональных антител. К 1977 году было получено 16 типов гибридом, синтезирующих разные типы моноклональных антител. Сначала гибридомные технологии основывались на использовании линий миеломных клеток мышей Balb/c. Впоследствии были получены другие линии клеток-носителей, в том числе и линии клеток человека. Тем не менее наиболее часто используют гибридомы на основе мышинных клеток. Важно отметить, что несмотря на преобладание практического аспекта применения гибридомных технологий были осуществлены теоретические исследования, подтвердившие клонально-селективную теорию синтеза антител. Банк гибридом пополняется за счет получения гибридом с заданными антигенами. В настоящее время гибридомная технология дает возможность получать моноклональные антитела в требуемых количествах.

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

для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные правила.

6. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.
7. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.
8. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.
9. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном материале авторов.
10. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.
11. Адрес редакции указан на титульном листе журнала.
12. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию.
13. Имеется электронный архив журнала на сайте Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (www.biorosinfo.ru).



Подписано к печати 28.12.15
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 4,0. Тираж 1000 экз.

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

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

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

Главными целями деятельности ОБР являются:

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

Для достижения этих целей ОБР осуществляет различные мероприятия, в том числе проводит конференции, симпозиумы, рабочие совещания. Регулярно проводится Съезд Общества биотехнологов России.

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

ОБР имеет отделения в 57 регионах России и объединяет свыше 3000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

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

Основой организационной деятельности 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